



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE

UFR AGROFORESTERIE

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2019-2020

N° D'ORDRE : 024

THESE DE DOCTORAT

Mention : Agriculture et foresterie tropicale

Spécialité : Microbiologie des sols

**Isolement et sélection de bactéries endophytes natives
du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) efficaces dans le
biocontrôle de *Phytophthora* spp., agent causal de la
pourriture brune des cabosses**

CANDIDAT

Nom : OUATTARA

Prénom : Adama

Soutenu publiquement le :
28 Novembre 2020

JURY

- Président** : M. KONE Tidiani, Professeur Titulaire, Université Jean Lorougnon GUEDE
- Co-Directeurs** : M. KONATE Ibrahim, Maître de Conférences, Université Jean Lorougnon GUEDE
M. KEBE Boubacar Ismaël, Directeur de Recherche, Centre National de Recherche Agronomique (CNRA)
- Rapporteur** : M. ALLOU Kouassi, Directeur de Recherche CAMES, Centre National de Recherche Agronomique (CNRA)
- Examineurs** : M. AKAFFOU Doffou Sélastique, Professeur Titulaire, Université Jean Lorougnon GUEDE
M. CAMARA Brahim, Maître de Conférences, Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

TABLE DES MATIÈRES

DEDICACE.....	x
REMERCIEMENTS	xi
SIGLES ET ABREVIATIONS.....	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTES DES FIGURES.....	xix
LISTES DES ANNEXES.....	xxiii
INTRODUCTION.....	1
PRÉMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
Chapitre 1 : Généralités sur le cacaoyer (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	7
1-1- Origine et historique	7
1-2- Classification botanique et taxonomique.....	7
1-2-1- Diversité des cacaoyers	7
1-2-2- Groupes de cacaoyers.....	8
1-2-2-1- Groupe des <i>Criollo</i>	8
1-2-2-2- Groupe des <i>Forastero</i> amazoniens	9
1-2-2-3- Groupe des Trinitario.....	9
1-3- Morphologie et biologie du cacaoyer	11
1-3-1- Système racinaire	12
1-3-2- Parties aériennes	13
1-3-2-1- Tronc	13
1-3-2-2- Feuilles	13
1-3-2-3- Inflorescences et fleurs	13
1-3-2-4- Fruits	14

1-4- Ecophysiologie du cacaoyer	14
1-4-1- Exigences climatiques	14
1-4-2- Sols favorables à la cacaoculture	15
1-5- Importance de la cacaoculture	15
1-5-1- Importance nutritionnelle et médicinale du cacao.....	15
1-5-2- Importance de la cacaoculture dans l'économie ivoirienne	16
1-5-3- Importances écologiques des agroforêts à base de cacaoyers	16
1-6- Maladies du cacaoyer	16
1-6-1- Maladies virales.....	16
1-6-1-1- Swollen shoot.....	16
1-6-1-2- Nécrose du cacaoyer	19
1-6-1-3- Virus de la mosaïque jaune du cacaoyer.....	19
1-6-2- Maladies fongiques	19
1-6-2-1- Balai de sorcière.....	19
1-6-2-3- Syndrome de dépérissement vasculaire	24
1-6-2-4- Pourridiés	26
1-6-2-5- Pourriture brune des cabosses	26
Chapitre 2 : Genre <i>Phytophthora</i>	27
2-1- Taxonomie	27
2-1-1- Règne.....	27
2-1-2- Ordre des Pythiales.....	27
2-1-3- Genre <i>Phytophthora</i>	28
2-2- Cycle biologique du genre <i>Phytophthora</i>	30
2-3- Mode de pénétration du genre <i>Phytophthora</i> dans les organes du cacaoyer	32

2-4- Espèces du genre <i>Phytophthora</i> sur le cacaoyer	32
2-5- Symptômes de la pourriture brune.....	32
2-6- Méthodes de lutte.....	35
2-6-1- Mise en quarantaine du matériel végétal.....	35
2-6-2- Lutte agronomique	35
2-6-3- Lutte chimique.....	36
2-6-4- Lutte génétique	38
2-6-5- Lutte biologique	39
Chapitre 3 : Généralités sur les bactéries endophytes	41
3-1- Diversité microbienne du sol.....	41
3-2- Rhizosphère	41
3-3- Bactéries endophytes	42
3-3-1- Bactéries endophytes symbiotiques	42
3-3-1-1- Genre <i>Frankia</i>	43
3-3-1-2- Rhizobia	43
3-3-2- Diversité des bactéries endophytes associatives	44
3-3-2-1- <i>Azotobacter</i> sp.....	45
3-3-2-2- <i>Azospirillum</i> sp.....	45
3-3-2-3- <i>Acetobacter</i> sp.....	45
3-3-2-4- <i>Azoarcus</i> sp.	46
3-3-2-5- <i>Bacillus</i> sp.....	46
3-3-2-6- <i>Pseudomonas</i> sp.....	46
3-3-2-7- Actinomycètes.....	47
3-3-2-8- <i>Clostridium</i> sp.	47

3-3-2-9- Rhizobiaceae	48
3-3-3- Effets bénéfiques des endophytes sur la plante	48
3-3-3-1- Biofertilisation	49
3-3-3-2- Mécanismes de biocontrôle.....	52
3-3-3-3- Bioremédiation des sols par les bactéries endophytes	55
3-3-4- Biopesticides	56
3-3-4-1- Définition	56
3-3-4-2- Avantages des biopesticides	57
3-3-4-3- Limites des biopesticides	57
3-3-5- Techniques d'étude des bactéries endophytes.....	58
3-3-5-1- Méthodes classiques basées sur l'isolement	60
3-3-5-2- Méthodes d'empreintes moléculaires d'études des communautés endophytes	61
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES	65
Chapitre 4 : Zone d'échantillonnage	66
Chapitre 5 : Matériel	68
5-1- Matériel végétal	68
5-1-1- Matériel végétal utilisé pour le piégeage des bactéries endophytes.....	68
5-1-2- Matériel végétal utilisé pour les tests d'antagonisme <i>in vitro</i> et <i>ex-vivo</i> contre les espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i>	68
5-2- Echantillons de sol.....	69
5-3- Matériel fongique	69
5-4- Matériel bactérien utilisé pour les tests d'antagonisme.....	71
5-5- Matériel technique	71
5-5-1- Matériel de terrain	71
5-5-2- Matériel de laboratoire	71

5-6- Milieux de culture.....	73
Chapitre 6 : Méthodes	74
6-1- Prospection et collecte des échantillons de sols	74
6-2- Mise en place de la pépinière	74
6-3- Isolement des bactéries endophytes.....	76
6-3-1- Isolement à partir des racines des jeunes plants de cacaoyers	76
6-3-2- Isolement à partir des tiges de jeunes plants de cacaoyers.....	76
6-3-3- Isolement à partir des feuilles de plantules de cacaoyer	76
6-4- Numération des densités bactériennes	78
6-5- Purification et conservation des bactéries endophytes	78
6-6- Caractérisation morphologique des bactéries endophytes.....	78
6-6-1- Examen macroscopique.....	78
6-6-2- Identification microscopique.....	79
6-6-3- Coloration de Gram.....	79
6-7- Caractérisation biochimique	79
6-7-1- Solubilisation du phosphate tricalcique [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$].....	79
6-7-2- Solubilisation du potassium (mica).....	80
6-7-3- Réduction du nitrate de potassium	80
6-7-4- Recherche de l'activité amylasique.....	80
6-8- Caractérisation physiologique	81
6-8-1- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens à la salinité (NaCl).....	81
6-8-2- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens au nitrite de sodium (NaNO_2).....	81
6-8-3- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens à l'urée.....	81
6-8-4- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens à l'engrais chimique NPK (0-23-19)	82

6-8-5- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens au pH	82
6-9- Effet des stress abiotiques sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	82
6-9-1- Effet des métaux lourds sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	82
6-9-2- Effet de la salinité (NaCl) sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	83
6-9-3- Effet du pH sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).....	83
6-10- Identification et caractères cultureux des isolats bactériens d'intérêt agricole	83
6-10-1- Réaction de la catalase	84
6-10-2- Identification et caractères cultureux des actinomycètes	84
6-10-3- Identification et caractères cultureux des <i>Pseudomonas</i> sp.	84
6-10-4- Identification et caractères cultureux des <i>Bacillus</i> sp.	84
6-11-1- Confrontation <i>in vitro</i> des bactéries endophytes et <i>Phytophthora palmivora</i>	85
6-11-2- Confrontation <i>in vitro</i> des bactéries endophytes et <i>Phytophthora megakarya</i>	85
6-11-3- Calcul des Taux d'inhibition (T.I.).....	85
6-11-4- Test de survie des espèces <i>Phytophthora megakarya</i> et <i>Phytophthora palmivora</i> sur les cabosses.....	88
6-11-5- Tests feuilles d'antagonisme	90
6-11-5-1- Préparation d'inoculum des endophytes bactériens	90
6-11-5-2- Préparation d'inoculum des zoospores de <i>Phytophthora palmivora</i> et de <i>Phytophthora megakarya</i>	90
6-11-5-3- Dispositif expérimental et technique d'inoculation	90
6-5-4- Lecture des symptômes	93
6-12- Analyses statistiques des données	94
TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION	95
Chapitre 7 : Isolement et sélection des bactéries endophytes du cacaoyer ayant des propriétés d'intérêt agronomique	96

7-1-Résultats.....	96
7-1-1- Bactéries endophytes isolées	96
7-1-2- Caractères morphologiques des isolats bactériens au microscope optique	99
7-1-3- Bactéries endophytes d'intérêt agricole sélectionnées	100
7-1-3-1- Fixation biologique de l'azote atmosphérique	100
7-1-3-2- Solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	100
7-1-3-3- Solubilisation du potassium (mica).....	106
7-1-3-4. Production d'amylase	110
7-1-3-5. Réduction du nitrate de potassium (KNO_3).....	112
7-1-3-6- Réduction du nitrite de sodium (NaNO_2).....	115
7-1-4- Caractérisation physiologique des isolats bactériens d'intérêt agronomique.....	117
7-1-4-1- Tolérance des bactéries endophytes du cacaoyer à la salinité (NaCl)	117
7-1-4-2- Tolérance des isolats à l'urée	120
7-1-4-3- Tolérance des isolats à l'engrais chimique NPK (0-23-19)	122
7-1-4-4- Tolérance des isolats bactériens au stress acido-basique.....	124
7-1-5- Solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sous stress abiotiques	126
7-1-5-1- Solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sous stress des métaux lourds	126
7-1-5-1-1- Effet du chlorure d'aluminium (AlCl_3)	126
7-1-5-1-2- Effet du chlorure de cadmium (CdCl_2).....	129
7-1-5-1-3- Effet du chlorure de cobalt (CoCl_2).....	132
7-1-5-1-4- Effet du sulfate de cuivre (CuSO_4)	135
7-1-5-1-5- Effet de l'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2,3\text{H}_2\text{O}$).....	138
7-1-5-1-6- Effet du sulfate de zinc (ZnSO_4).....	141
7-1-5-2- Sélection des isolats multi-résistants aux métaux lourds par analyse en composantes principales (ACP).....	144

7-1-5-3- Effet du stress salin sur la capacité solubilisatrice des bactéries endophytes du cacaoyer	146
7-1-5-4- Solubilisation du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sous stress acido-basique (pH)	149
7-1-6- Caractères biochimiques et culturaux des isolats	151
7-1-6-1- Production de la catalase	151
7-1-6-2- Caractères culturaux sur gélose au cétrimide	151
7-1-6-3- Caractères culturaux sur milieux spécifiques aux Actinomycètes	152
7-1-6-4- Caractères culturaux sur gélose de Mossel	152
7-1-7- Identification préliminaires des isolats bactériens d'intérêt agronomique	152
7-2-Discussion	154
7-2-1- Isolement des bactéries endophytes	154
7-2-2- Caractères biochimiques des isolats bactériens d'intérêt agronomique	155
7-2-3- Caractérisation physiologique	160
7-2-4- Caractères biochimiques et culturaux des isolats bactériens d'intérêt agronomique	164
7-3- Conclusion partielle	165
Chapitre 8 : Évaluation de l'efficacité des bactéries endophytes antagonistes des deux espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i> dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses	166
8-1-Résultats	166
8-1-1- Tests d'antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries endophytes contre les espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i>	166
8-1-1-1- Tests d'antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries endophytes contre l'espèce <i>Phytophthora palmivora</i>	166
8-1-1-2- Tests d'antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries endophytes contre l'espèce <i>Phytophthora megakarya</i>	171

8-1-1-3- Test de survie des espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i> sur cabosses.....	177
8-1-2- Tests d'antagonisme <i>ex- vivo</i> sur disques foliaires	179
8-1-2-1- Effet des traitements bactériens sur la sensibilité des clones SCA6, PA150 et NA32 aux espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i>	179
8-1-2-2- Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce <i>Phytophthora megakarya</i>	184
8-1-2-3- Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce <i>Phytophthora palmivora</i>	187
8-2- Discussion.....	190
8-2-1- Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	190
8-2-2- Test d'antagonisme <i>ex- vivo</i> par tests feuilles	191
8-3- Conclusion partielle.....	193
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	194
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	198

DEDICACE

A la mémoire de mon père OUATTARA Ladji et de ma chère mère OUATTARA Djatta, qu'Allah Le Tout Miséricordieux les accueille dans Son Paradis Firdaw (Amîne).

REMERCIEMENTS

Je prie Mme TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE, Professeur Titulaire en Ecotoxicologie, Présidente de l'Université Jean Lorougnon GUEDE, d'accepter l'expression de ma profonde gratitude pour avoir autorisé mon inscription en thèse de Doctorat dans l'université dont elle assure la plus haute responsabilité.

J'exprime ma gratitude à M. YTE Wongbé, Directeur général du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), pour m'avoir accepté dans sa structure et pour m'avoir accordé le financement pour la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à :

- M. KONE Tidiani, Professeur Titulaire en Hydrobiologie, Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon GUEDE, Chargé de la Pédagogie, de la Vie Universitaire, de la Recherche et de l'Innovation pour son dévouement à la recherche scientifique. Permettez-moi Professeur de vous remercier en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Et d'avoir apporté votre expertise dans l'amélioration de ce manuscrit.

- M. AKAFFOU Doffou Sélastique, Professeur Titulaire en Génétique et Amélioration des Plantes, Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon GUEDE, pour ses conseils et son dévouement à la recherche scientifique. Je voudrais vous remercier d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et dont les critiques ont permis d'améliorer ce manuscrit.

- M. BEUGRE Grah A. Maxwell, Professeur Titulaire en Biochimie, à l'Université Jean Lorougnon GUEDE et Directeur du laboratoire d'Agrovalorisation. Merci infiniment de m'avoir accepté au sein de votre laboratoire. Merci infiniment pour vos remarques constructives apportées à l'élaboration de ce manuscrit.

- M. KOUAME Kouamé Victor, Maître-Assistant et Directeur de la Scolarité de l'Université Jean Lorougnon GUEDE et tous ces collaborateurs pour l'oreille attentive qu'ils ont toujours prêtée à nos préoccupations.

- Mme. TONESSIA Dolou Charlotte, Maître de Conférences en Phytopathologie, Directeur de l'UFR (Unité de Formation et de Recherche) Agroforesterie à l'Université Jean Lorougnon GUEDE, pour sa disponibilité et son dévouement à la recherche scientifique.

- M. KONATE Ibrahim, Maître de Conférences en Microbiologie des Sols, à l'Université Jean Lorougnon GUEDE, Co-Directeur de cette thèse, pour avoir accepté mon encadrement scientifique. Merci infiniment pour tous les moyens financiers et matériels que vous avez mis à ma disposition pour l'accomplissement de ce travail. Je vous suis reconnaissant pour votre humilité, votre disponibilité, votre rigueur, votre abnégation dans le travail et vos conseils.
- M. KEBE Boubacar Ismaël, Directeur de Recherche en Phytopathologie au CNRA (Centre National de Recherche Agronomique), Responsable du Département des cultures d'exportation et des ressources forestières et Co-Directeur de ma thèse, pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Je vous suis reconnaissant pour votre soutien moral et financier.
- M. ALLOU Kouassi, Directeur de Recherche CAMES en Phytopathologie, Directeur de la station de Recherche du CNRA de la Me. Je voudrais vous remercier d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et dont les remarques m'ont permis d'améliorer ce mémoire.
- M. CAMARA Brahima, Maître de Conférences en Phytopathologie à l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY de Cocody. Merci infiniment d'avoir accepté d'être examinateur dans ce jury et dont les critiques ont permis d'améliorer ce manuscrit.
- M. COULIBALY Klotioloma, Chargé de Recherche en Agrophysiologie, Chef de Programme Cacao au CNRA (Centre National de Recherche Agronomique), pour m'avoir fait confiance et d'avoir accepté d'être mon Maître de stage durant ces années de thèse. Je vous suis reconnaissant pour tous les moyens financiers, matériels et les conseils que vous m'avez donnés pour le bon accomplissement de ce travail. Merci infiniment à vous et votre famille pour l'hospitalité que vous m'avez accordée à Divo.
- Mme. TRAORE Karidia, Professeur Titulaire en Biologie et Ecologie Végétales, ex-Directrice de l'UFR (Unité de Formation et de Recherche) Agroforesterie à l'Université Jean Lorougnon GUEDE, pour avoir accepté mon inscription en thèse, sa disponibilité et son dévouement à la recherche scientifique.
- M. KOFFIN'goran Mathurin, Maître de Conférences en Génétique et Epidémiologie Moléculaire à l'Université Jean Lorougnon GUEDE, Merci infiniment pour vos conseils et votre dévouement à la recherche scientifique.

- M. KONE Boaké, Chercheur, ex-Directeur de la Station CNRA (Centre National de Recherche Agronomique) de Divo, pour m’ avoir accepté au sein de sa structure et d’ avoir mis à ma disposition les moyens financiers et matériels pour la collecte des échantillons de sols et du matériel végétal.
- M. TAHI Mathias, Directeur de la station du CNRA (Centre National de Recherche Agronomique) de Divo, pour ses conseils et son dévouement pour la recherche.

Je remercie tous les Enseignants-Chercheurs du Département de Biochimie de l’Université Jean Lorougnon GUEDE particulièrement Messieurs VOKO Bi Rosin Don Rodrigue, (Maître-Assistant), OUINA Serge (Maître-Assistant), Messieurs KOUASSI Clément, COULIBALY Bakary et COULIBALY Bourahema tous Maîtres de Conférences pour leurs conseils constructifs apportés lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie sincèrement M. COULIBALY Souleymane, Directeur de Recherche en Génie des Procédés et en Science et Technologie des Aliments à la Station de Recherche et Technologie SRT-CNRA de Bingerville et M. BAKAYOKO Ibrahim, Directeur des ressources humaines de la SRT-CNRA de Bingerville pour leur soutien moral et leur fraternité.

J’exprime ma profonde gratitude à Messieurs SÉKOU Aïdara, AKA AKA Romain, pour leur appui scientifique et leurs encouragements. A mes amis doctorants et stagiaires de la station de Divo KOFFI Hypolithe, OUATTARA Yaya, CAUDOU Pellou, OUATTARA Kouassi Mahama, KOUAME Tchrewa Stanislas, ATCHI Yves Mathurin, pour leurs conseils et leurs encouragements.

J’exprime ma gratitude et mes sincères remerciements à M. COULIBALY Bakary, Technicien Supérieur, à M. TOURE Laurent, Auxiliaires de Recherches au Laboratoire de Phytopathologie CNRA de Bingerville et à M. KONE Yacouba pour les efforts et sacrifices consentis lors la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer tous mes sincères remerciements à toute ma famille, pour la patience et pour le soutien financier et moral infailible qu’ elle m’ a toujours apporté. Particulièrement à mon oncle OUATTARA Bassirima et sa femme OUATTARA Fanta, à ses petits frères OUATTARA Aboulaye, OUATTARA Boukary, OUATTARA Kassoum, OUATTARA Allassane, OUATTARA Lassina et OUATTARA Ousmane.

Je dis infiniment merci à ma tante OUATTARA Minata pour les sacrifices consentis et les conseils. J'exprime ma gratitude et mes sincères remerciements à mon grand-frère OUATTARA Ali, à mon petit frère OUATTARA Kanigui et à mes petites sœurs OUATTARA Alimenta et OUATTARA Mariam pour le soutien financier et moral qu'ils m'ont toujours apporté.

Je remercie ma fiancée OUATTARA Margueritte et à toute sa famille, pour le soutien moral et la patience.

Je remercie infiniment mes amis doctorants AMANI Kouadio et GUEI Nassé Kaeda Raïssa pour leurs conseils et leur soutien moral. Ensemble, nous formons une équipe très dynamique et très joyeuse. Je tiens aussi à dire merci à mes amis ATTA Kouadjo Léonard, DOUMBYA Bakary, OUATTARA Abdoulaye, KONATE Stapha pour leur soutien moral et leur fraternité.

Je réitère mes sincères remerciements à M. KONE Sidiki, au Centre de Recherche des Œuvres Universitaires CROU Daloa pour le soutien moral et financier qu'il m'a accordé durant ce parcours universitaire, merci infiniment.

Je voudrais enfin remercier tous ceux et toutes celles qui de près ou de loin m'ont aidé dans la réalisation de ce travail et dont je n'ai pas cité les noms dans ce manuscrit, merci infiniment à vous.

SIGLES ET ABREVIATIONS

p/v	Poids sur volume
P1000	Micropipette 1000 microlitres
P20	Micropipette 20 microlitres
UFC	Unité formant colonie
UFC/g	Unité formant colonie par gramme
ISP1, ISP2, ISP3, ISP4	International <i>Streptomyces</i> Project
PVK	De « Pikovkaya »
SMK	krasilnikov's synthetic agar
YEM	Yeast extract mannitol
YEMA	Yeast extract mannitol agar
IMC	Iquitos Mixed Calabacillos
P7	Pound 7
PA150	Parinari 150
SCA6, SCA12	Scavina 6, Scavina 12
SNK	Selection of Nkoemvone
ARNr	Acide Ribonucléique Ribosomique
ATP	Adénosine Triphosphate
C	Cytosine
G	Guanine
AFLP	Polymorphisme De Longueur De Fragments Amplifiés
ARDRA	De 'Amplified Ribosomal DNA- Restriction Analysis'
BOX-PCR	De 'BOX-A1R-Based Repetitive Extragenic Palindromic-PCR"
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
PCR	Polymearse Chain Reaction
RAPD	Polymorphisme de l'ADN Amplifié au Hasard
Rep-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	Repetitive extragenetic palindromic-PCR'
TGGE	Temperature gradient gel electrophoresis
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

ANOVA	Analyse de la variance
PROC GLM	Process of general linear model
CCC	Conseil Café-Cacao
CNRA	Centre National de Recherche Agronomique
ICCO	International Cocoa Organization
ONU-REDD	Programme des Nations Unies pour la Réduction des Emissions de gaz à effet de serre issues de la Déforestation et la Dégradation forestière
pH	Potentiel d'hydrogène
RSI	Résistance systémique induite
UFR	Unité de Formation et de Recherche
DPVCQ	Direction de la Protection des Végétaux, du Contrôle et de la Qualité

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Liste des principaux fongicides utilisés dans la lutte contre la pourriture brune en Côte d'Ivoire.....	37
Tableau II : Avantages et inconvénients des techniques moléculaires d'empreintes génétiques.	62
Tableau III : Différents milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'étude des caractères culturaux des bactéries endophytes du cacaoyer	73
Tableau IV : Nombre de bactéries endophytes obtenu selon les organes, les variétés et les localités	98
Tableau V : Indices de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction des bactéries endophytes du cacaoyer	102
Tableau VI : Indices de solubilisation du potassium (mica) en fonction des bactéries endophytes du cacaoyer	107
Tableau VII : Effet du nitrate de potassium (NaNO_2) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer	114
Tableau VIII : Effet du nitrite de sodium (NaNO_2) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer	116
Tableau IX : Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer	119
Tableau X : Effet de l'urée sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer	121
Tableau XI : Effet de l'engrais NPK (0-23-19) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer	123
Tableau XII : Effet du pH sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer	125
Tableau XIII : Effet du chlorure d'aluminium (AlCl_3) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par les bactéries endophytes du cacaoyer.....	128
Tableau XIV : Effet du Chlorure de cadmium (CdCl_2) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer.....	131
Tableau XV : Effet du chlorure de cobalt (CoCl_2) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer.....	134

Tableau XVI : Effet du sulfate de cuivre (CuSO_4) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer.....	137
Tableau XVII : Effet de l'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer	140
Tableau XVIII : Effet du sulfate de zinc (ZnSO_4) sur la qualité de solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer.....	143
Tableau XIX : Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer.....	148
Tableau XX : Effet du pH sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer	150
Tableau XXI : Tableau de synthèse de la caractérisation biochimique et des caractères culturels des isolats d'intérêt agronomique	153
Tableau XXII : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de <i>Phytophthora palmivora</i> BL7.11.2 après 30 jours de confrontation	168
Tableau XXIII : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de <i>Phytophthora megakarya</i> 13P30.1 après 30 jours de confrontation.....	172

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Différents types de cabosses mûres de cacaoyer	10
Figure 2 : Cacaoyer en production à la station CNRA de Divo	11
Figure 3 : Architecture générale du système racinaire d'un cacaoyer adulte	12
Figure 4 : Symptômes de la maladie du swollen shoot sur les différentes parties cacaoyer au champ	18
Figure 5 : Symptômes du balai de sorcière au champ sur le cacaoyer	21
Figure 6 : Symptômes de moniliose sur cabosses de cacaoyer	23
Figure 7 : Symptôme du syndrome de dépérissement vasculaire (VSD) sur le cacaoyer	25
Figure 8 : Arbre phylogénétique du genre <i>Phytophthora</i> spp.	29
Figure 9 : Cycle biologique de reproduction du genre <i>Phytophthora</i> spp.	31
Figure 10 : Evolution de la maladie de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer	34
Figure 11 : Schématisation des méthodes d'études des bactéries endophytes des plantes	59
Figure 12 : Régions et sites de collectes des échantillons de sol dans les plantations de cacaoyer	67
Figure 13 : Colonies des espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i> sur le milieu de culture carotte-agar	70
Figure 14 : Pépinière de cacaoyer pour le piégeage des rhizobactéries indigènes.....	75
Figure 15 : Isolement des bactéries endophytes du cacaoyer	77
Figure 16 : Mesure de la croissance mycélienne du genre <i>Phytophthora</i>	87
Figure 17 : Test de survie du genre <i>Phytophthora</i> sur les cabosses de cacaoyers	89
Figure 18 : Dispositif expérimental.....	92
Figure 19 : Indices de sensibilité selon l'échelle de Blaha	93
Figure 20 : Colonies de bactéries endophytes isolées à partir des oraganes de cacaoyers	97
Figure 21 : Aspect des colonies bactériennes au microscope (Grossissement X 400)	99
Figure 22 : Morphologie et mode de regroupement des souches révélés par coloration de Gram (GX1000).....	99
Figure 23 : Solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu Pikovkaya (PVK).	101
Figure 24: Indices moyens ajustés de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction de la provenance des sols.....	103

Figure 25 : Indices de solubilisation du phosphate tricalcique des bactéries endophytes du cacaoyer en fonction de leurs provenances	105
Figure 26 : Solubilisation du mica sur milieu Aleksandrov modifié	106
Figure 27 : Indices de solubilisation du mica (potassium) par les bactéries endophytes du cacaoyer en fonction de la provenance du sol.	108
Figure 28 : Indices de solubilisation du mica par les bactéries endophytes du cacaoyer en fonction de leurs provenances	109
Figure 29 : Mise en évidence de la production d'amylase par les souches bactériennes étudiées	111
Figure 30 : Effet du nitrate de potassium (KNO_3) sur la survie des bactéries endophytes du cacaoyer	112
Figure 31 : Taux des isolats bactériens tolérants en fonction de différentes concentrations de nitrate de potassium KNO_3	113
Figure 32 : Effet du nitrite de sodium ($NaNO_2$) sur la survie des bactéries endophytes du cacaoyer	115
Figure 33 : Taux d'isolats bactériens tolérants en fonction de différentes concentrations de chlorure de sodium ($NaCl$)	117
Figure 34 : Effet du chlorure de sodium ($NaCl$) sur la survie des bactéries endophytes du cacaoyer	118
Figure 35 : Effet de l'engrais NPK sur la croissance et la survie des bactéries endophytes du cacaoyer	122
Figure 36 : Taux d'isolats bactériens tolérants en fonction de la concentration de NPK(0-23-19) dans le milieu de culture	122
Figure 37 : Taux d'isolats bactériens tolérants en fonction du pH du milieu de culture	124
Figure 38 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ($Ca_3(PO_4)_2$) en fonction de différentes concentrations de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) ajoutées au milieu de culture PVK.....	127
Figure 39 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction de différentes concentrations de chlorure de cadmium ($CdCl_2$) ajoutées au milieu de culture PVK.....	130

Figure 40 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en fonction de différentes concentrations de chlorure de cobalt (CoCl_2) ajoutées au de culture milieu PVK.....	133
Figure 41 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en fonction de différentes concentrations de sulfate de cuivre (CuSO_4) ajoutées au milieu de culture PVK.....	136
Figure 42 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction de différentes concentrations d'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ajoutées au milieu de culture PVK	139
Figure 43 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en fonction de différentes concentrations de sulfate de zinc (ZnSO_4) ajoutées au milieu de culture PVK.....	142
Figure 44 : Cercle de corrélation des métaux lourds dans le plan formé par les axes (Dim1 et Dim 2) de l'analyse en composantes principales (ACP).....	145
Figure 45 : Projection des isolats bactériens dans le plan formé par les axes (Dim1 et Dim2) de l'analyse en composantes principales (ACP).....	145
Figure 46 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en fonction de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) ajoutées au milieu de culture PVK	147
Figure 47 : Aspect des souches <i>Pseudomonas</i> sp. sur la gélose au cétrimide	151
Figure 48 : Aspect des souches <i>Bacillus</i> sp. sur le milieu Mossel.....	152
Figure 49 : Effet d'antagonisme <i>in vitro</i> de quelques bactéries endophytes du cacaoyer contre les espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i>	176
Figure 50 : Lecture des tests de survie et d'agressivité des espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i> après 5 jours d'incubation	178
Figure 51 : Effet des traitements bactériens sur la sensibilité des clones NA32, PA150 et SCA6 aux espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i>	181
Figure 52 : Effet fongicide des endophytes bactériens (18N et 48P) sur les espèces <i>Phytophthora palmivora</i> et <i>Phytophthora megakarya</i> au niveau des disques foliaires du clone NA32	183
Figure 53 : Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce <i>Phytophthora megakarya</i>	185

Figure 54 : Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce
Phytophthora palmivora188

LISTES DES ANNEXES

Annexe 1 :	Composition des milieux de culture pour la caractérisation phénotypique des bactéries endophytes (g/l).....	b
Annexe 2 :	Composition du milieu PVK Solide.....	e
Annexe 3 :	Composition du milieu Aleksandrov modifié.....	f
Annexe 4 :	Préparation et composition des milieux de culture utilisés pour <i>Phytophthora</i> spp.....	f
Annexe 5 :	Caractérisation microscopiques des bactéries endophytes isolées de cacaoyer (<i>Theobroma cacao</i> L).....	h
Annexe 6 :	Identification des isolats solubilisant le phosphate tricalcique.....	o
Annexe 7 :	Pourcentage d'inhibition des bactéries endophytes du cacaoyer contre <i>Phytophthora palmivora</i>	r

INTRODUCTION

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une plante tropicale de la famille des Malvacées qui a été introduite en Côte d'Ivoire à la fin du 19^{ème} siècle dans sa région Est (Bastide, 2007 ; Kouakou *et al.*, 2013). Après des débuts difficiles, la cacaoculture ivoirienne a connu une expansion très rapide grâce à la disponibilité de terres fertiles dans la zone forestière et un afflux de main d'œuvres depuis l'intérieur et l'extérieur de la Côte d'Ivoire (ONU-REDD, 2016 ; Koua *et al.*, 2018). Aujourd'hui, la filière cacao constitue un secteur économique et social de prime importance pour le pays (Coulibaly, 2014 ; ONU-REDD, 2016). Ce secteur contribue à 15 % du Produit Intérieur Brut (PIB) et à 40 % des recettes d'exportation du pays (Dufumier, 2016). Avec une récolte annuelle de 1 964 000 tonnes soit 42,22 % de la production mondiale au cours de la campagne 2018-2019, la Côte d'Ivoire reste au niveau mondial le premier pays producteur de cacao (ICCO, 2019).

Malgré cette forte production, la cacaoculture ivoirienne est menacée par l'apparition de nouvelles maladies telles que la pourriture brune des cabosses et le swollen shoot (Assiri *et al.*, 2012 ; Ploetz, 2016). A ces difficultés, s'ajoutent les attaques d'insectes ravageurs (mirides, foreurs de troncs, scolytes, punaises), la baisse de la fertilité des sols et la sécheresse (CCC, 2014 ; N'Guessan *et al.*, 2016). Face à toutes ces difficultés, certains producteurs abandonnent souvent leurs vergers de cacaoyers ou les reconvertissent en d'autres cultures pérennes : l'hévéa et le palmier à huile (Assiri *et al.*, 2015 ; Dufumier, 2016).

En Côte d'Ivoire, la pourriture brune des cabosses due à *Phytophthora* spp., constitue l'une des maladies les plus agressives observées chez le cacaoyer (Coulibaly *et al.*, 2018). Elle est en effet responsable d'énormes pertes comprises entre 44 et 80 % des récoltes (Coulibaly *et al.*, 2018 ; Koua *et al.*, 2018). La lutte contre cette maladie du cacaoyer est donc primordiale (Mpika *et al.*, 2009; Pohé *et al.*, 2013 ; Coulibaly *et al.*, 2018). Généralement, la lutte chimique a été adoptée avec l'utilisation des fongicides cupriques de contact ou systémiques à base de métalaxyl (Pohé *et al.*, 2013 ; Bailey *et al.*, 2016). Mais, ces produits chimiques peuvent entraîner l'accumulation des métaux lourds dans les fèves de cacao puis dans le sol (Pohé *et al.*, 2013 ; Yapo *et al.*, 2014 ; Gramlich *et al.*, 2016). Entraînant ainsi des troubles de santé humaine et perturbant les interactions entre les microorganismes et le sol. De même, ces produits chimiques peuvent entraîner la prolifération des agents pathogènes et la pollution environnementale (Deberdt *et al.*, 2008; Gockowski *et al.*, 2010 ; Sahu *et al.*, 2014).

Des méthodes de lutte agronomique (recolte sanitaire, diminution de l'ombrage, paillage etc...) et de lutte génétique (sélection variétale) ont été aussi appliquées en combinaison avec la lutte chimique (Kébé *et al.*, 2009 ; Pokou *et al.*, 2009; Tahi *et al.*, 2017). Mais jusqu'à ce jour aucune d'elles ne s'est révélée totalement efficace contre cette affection, faute de moyens humains et financiers nécessaires pour sa mise en œuvre (Coulibaly *et al.*, 2018).

Au vu de ces inconvénients et des effets délétères des pesticides synthétiques sur l'environnement et les organismes non ciblés, d'autres stratégies de lutte intégrée doivent être explorées afin de réduire l'utilisation massive des produits chimiques dans la cacaoculture (ten Hoopen & Krauss, 2016). Car la sécurité et la qualité alimentaire sont devenus aujourd'hui la priorité de tous (Kareem, 2016). L'une des options de lutte intégrée est la lutte biologique contre des maladies du cacaoyer par le développement de biopesticides (ten Hoopen & Krauss, 2016). Celle-ci semble moins dangereuse pour la santé humaine, respectueuse de l'environnement et accessible à moindre coût (Melnick *et al.*, 2011 ; Crowder & Harwood, 2014). Les biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent être constitués d'organismes (plantes, insectes et nématodes) ou de microorganismes (bactéries, levures, champignons et virus) ou de substances naturelles (des extraits végétaux et des phéromones) exerçant une activité protectrice sur les plantes vis-à-vis des agents phytopathogènes (Thakore, 2006 ; ten Hoopen & Krauss, 2016). Ils sont moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène (Deravel *et al.*, 2014 ; Tijjani *et al.*, 2016). Ces biopesticides font l'objet de recherches poussées car leur faible toxicité et leur haute sélectivité en font des « pesticides écologiques » (Appert & Deuse, 1982).

Des études ont montré que les biopesticides produits à base de bactéries ou de champignons endophytes des cacaoyers luttent efficacement contre la pourriture brune des cabosses (Thomas *et al.*, 2011 ; Melnick *et al.*, 2011 ; Senthil-Nathan, 2015). En effet, les cacaoyers abritent des bactéries endophytes dans leurs organes végétatifs : racines, tiges, feuilles, cabosses, fleurs (Mpika *et al.*, 2009 ; Melnick *et al.*, 2011 ; Konaté *et al.*, 2015 b ; Akrofi, 2015 ; Khaeruni *et al.*, 2019). Ces bactéries endophytes sont plus compétitives au niveau de la plante que les bactéries exophytes qui vivent dans la rhizosphère ou dans la phyllosphère. Car leur migration dans les tissus végétaux est sélective et est régulée par des gènes. Cela permet à ces bactéries d'avoir une bonne interaction avec la plante hôte (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006). Par ailleurs, ces bactéries peuvent contribuer indirectement à la défense naturelle de la plante ou biocontrôle par plusieurs

mécanismes : production d'enzymes lytiques, de sidérophores, de chitinases ou par induction de résistance systémique chez la plante hôte (Garcia-Fraile *et al.*, 2015 ; Parray *et al.*, 2016).

Outre cette activité de lutte biologique, ces bactéries endophytes possèdent aussi parfois des propriétés de promotion de la croissance des plantes (Konate *et al.*, 2014 a, b). Car elles peuvent améliorer la croissance des plantes à travers la fixation biologique de l'azote moléculaire (N₂), la production de phytohormones (acide indole acétique, gibbérellines, cytokinines), la solubilisation des phosphates, du potassium et du fer (Joo *et al.*, 2009 ; Garcia-Fraile *et al.*, 2015 ; Tiwari *et al.*, 2016). Ainsi, disposer de bactéries endophytes antagonistes des agents pathogènes du genre *Phytophthora* spp., et capables de mobiliser les éléments nutritifs essentiels pour la plante serait intéressant pour la cacaoculture. Cela pourrait réduire les utilisations abusives de pesticides et d'engrais chimiques dans la cacaoculture ivoirienne.

Pour mener à bien ce travail des questions de recherche méritent d'être investiguées : (1) Les cacaoyers locaux hébergent-ils naturellement des bactéries endophytes d'intérêt agronomique et environnemental ? (2) Les cacaoyers locaux hébergent-ils naturellement des bactéries endophytes antagonistes des espèces fongiques *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* responsables de la pourriture brune des cabosses ? (3) Ces bactéries endophytes peuvent-elles être utilisées dans la biofertilisation des sols sous cacaoyers et dans le biocontrôle de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer?

C'est pour répondre à ces questions que cette étude a été entreprise. Elle a donc eu pour objectif général de rechercher des bactéries endophytes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) capables d'améliorer la croissance de la plante et de lutter contre la pourriture brune des cabosses. Il s'agit d'isoler des bactéries endophytes ayant des propriétés de biocontrôle, de biofertilisation et de biorémediation des sols. Deux objectifs spécifiques y sont attachés :

- (i) isoler et sélectionner des bactéries endophytes natives des cacaoyers qui ont des propriétés d'intérêt agronomique. Cela consistera à sélectionner des bactéries endophytes capables de fixer l'azote, de solubiliser le phosphate tricalcique et le potassium. Ensuite, étudier l'influence des intrants chimiques (NPK, KNO₃, Urée, métaux lourds) et autres stress abiotiques (pH, salinité, température etc.) sur la survie et la viabilité de ces bactéries endophytes ;
- (ii) évaluer l'efficacité des bactéries endophytes antagonistes des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer.

Hors mis l'introduction, la conclusion et les perspectives, les références bibliographiques et les annexes, ce mémoire s'articule en trois grandes parties qui se présentent comme suite :

- la première partie présente la revue bibliographique. Cette partie est subdivisée en trois chapitres. Le premier chapitre (Chapitre 1) présente les généralités sur le cacaoyer et les maladies qui l'affectent. Le deuxième chapitre (Chapitre 2) présente le genre *Phytophthora* spp., agent responsable de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer. Enfin, le troisième chapitre (Chapitre 3) porte sur les bactéries endophytes des plantes et leurs interactions avec celles-ci ;

- la deuxième partie présente les matériel et méthodes utilisés dans cette étude. Elle est subdivisée en trois chapitres. Le premier chapitre (Chapitre 4) présente la zone d'étude, le deuxième chapitre (Chapitre 5) porte sur le matériel utilisé et le troisième chapitre (Chapitre 6) porte sur les méthodes utilisées pour la réalisation de cette étude.

- la troisième partie concerne les résultats et leur discussion. Elle est subdivisée en deux chapitres. Le premier chapitre (Chapitre 7) présente les résultats de l'isolement et de la sélection des bactéries endophytes du cacaoyer ayant des propriétés d'intérêt agronomique. Le deuxième chapitre (Chapitre 8) présente les résultats de l'évaluation de l'efficacité des bactéries endophytes antagonistes des deux espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses.

PRÉMIÈRE PARTIE :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Généralités sur le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.)

1-1- Origine et historique

L'histoire moderne du cacao commence, comme pour bien d'autres plantes, avec la découverte du nouveau monde par Christophe Colomb. Originaire du nord de l'Amérique du Sud, le cacaoyer était cultivé par les Mayas, bien avant l'arrivée des européens (Braudeau, 1969). Au XIV^{ème} siècle, les Aztèques accompagnaient les étapes de sa culture par des cérémonies religieuses (Mc Neil, 2009). L'usage qu'on en faisait au moment où les espagnols débarquaient au Mexique est assez différent de celui que nous connaissons aujourd'hui. Il constituait une monnaie et aussi un breuvage nourrissant (Henderson *et al.*, 2007).

Du fait de l'engouement des européens pour le chocolat, la culture du cacaoyer se développa dans d'autres régions du monde, tout d'abord dans les Antilles notamment à Trinidad et en Jamaïque. Rapidement, les différentes puissances colonisatrices répandirent sa culture dans leurs colonies respectives. C'est ainsi que les espagnols l'introduisirent pour la première fois en Asie, aux Philippines vers 1600, les Portugais la développèrent au Brésil à partir de 1740. L'introduction du cacaoyer en Afrique est plus récente. C'est à partir des îles Fernando Poo (aujourd'hui Malabo), que le cacaoyer a été introduit en Afrique en 1822. Les missionnaires suisses l'ont introduit au Ghana en 1857, tandis que les Allemands l'ont introduit au Cameroun en 1892 à partir des îles de Sao Tome et Principe. Le cacaoyer a été introduit en Côte d'Ivoire en 1890 dans sa région Ouest et en 1900 dans sa région Est (Ndoumbe, 2002 ; Bastide *et al.*, 2007).

1-2- Classification botanique et taxonomique

1-2-1- Diversité des cacaoyers

La première description du cacaoyer a été faite par Hernandez en 1630 sous les noms mexicains : cacahoquahnitl et cacahoatl, désignant respectivement l'arbre et les graines. Linné (1737) préféra substituer au nom cacahoquahnitl celui de «*Theobroma*», dont le découpage est du grec *theos* = dieux, et *broma* = nourriture, autrement dit « nourriture des dieux », ce qui rappelait l'origine divine que lui attribuaient les Aztèques (Ndoumbe, 2002). Le genre *Theobroma* (2n=20) compte 22 espèces dont *Theobroma cacao* est la seule espèce cultivée à titre commercial. En effet, elle produit des graines destinées à la préparation du chocolat ou à l'extraction de beurre de cacao (Zhang *et al.*, 2011 a).

1-2-2- Groupes de cacaoyers

Les cacaoyers cultivés dans le monde présentent une très grande variabilité dans les caractères de couleurs, de dimensions et de formes des différentes parties de la fleur, des fruits et de la graine (Braudeau, 1969). Cela explique la confusion qui a longtemps régné dans leur taxonomie. Les théories qui ont été échaufaudées pour expliquer les différentes formes rencontrées, manquent de données historiques. Du fait que tous les types de cacaoyers sont interfertiles, donnant des hybrides vigoureux et fertiles sans qu'aucune barrière génétique ne soit rencontrée. On doit admettre qu'ils appartiennent tous à une seule espèce *Theobroma cacao*. Herman *et al.* (2010) ont défini la taxonomie du cacaoyer comme indiqué ci-dessous.

Règne	:	Végétal
Super division	:	Spermaphyte
Division	:	Magnoliophyta
Classe	:	Dicotylédones
Ordre	:	Malvales
Famille	:	Malaceae
Genre	:	<i>Theobroma</i>
Espèce	:	<i>Theobroma cacao</i> L.

C'est dans l'espèce *Theobroma cacao*, tribu des Byttneriées, ordre des Tiliales et famille des Malvacées que se classent aujourd'hui tous les cacaoyers cultivés (Bayer & Kubitzki, 2003). Cependant, il est possible de répartir les cacaoyers cultivés en trois groupes et cette répartition est généralement admise par tous. Ces groupes sont les *Criollo*, les *Forastero* amazoniens et les *Trinitario* (Herman *et al.*, 2010).

1-2-2-1- Groupe des *Criollo*

L'appellation « *Criollo* » (indigène) fut à l'origine attribuée par les espagnols aux cacaoyers cultivés initialement au Venezuela et dont les fèves aux cotylédons blancs fournissaient un produit de très haute qualité. Les *Criollo* sont caractérisés par des staminodes de couleur rose pâle, des cabosses généralement allongées avec une pointe très accentuée à l'extrémité inférieure. Leurs cabosses de couleur verte ou violette avant maturité devenant jaune-orange ou rouge à maturité. Elles sont profondément marquées de dix sillons égaux ou parfois repartis en deux groupes de cinq alternés dont un moins accentué. (Figure 1).

Les fèves sont dodues à section presque ronde et les cotylédons frais sont de couleur blanche. Les *Criollo* sont très sensibles aux maladies, notamment la pourriture brune des cabosses et sont peu cultivés (Iwaro *et al.*, 2006 ; Guest & Kaene, 2007 ; Clement *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2013).

1-2-2-2- Groupe des *Forastero* amazoniens

Les *Forastero* regroupent tous les cacaos courants du Brésil, de l’Afrique de l’Ouest ainsi que le cacao « *nacional* » de l’Equateur (Herman *et al.*, 2010). Ces cacaos sont caractérisés par des staminodes pigmentés de couleur violet, des cabosses vertes devenant jaunes à maturité, de forme ovale, sans sillon profond et à coques épaisses et dures (Figure 1). Les fèves sont plus ou moins aplaties aux cotylédons frais de couleur violet ou pourpre foncé. L’*Amelonado* africain est rattaché à ce groupe qui fournit la grande majorité des cacaoyers courants. Les *Amelonado* Bas-Amazoniens et Haut-Amazoniens sont aussi des *Forastero* qui semblent plus vigoureux et plus résistants aux maladies telle que la pourriture brune par rapport aux types *Criollo* et *Trinitario* (Iwaro *et al.*, 2006 ; Guest & Kaene, 2007). Les *Forastero* fournissent un cacao de qualité moyenne et donnent 80 % de la production mondiale soit 1 571 200 tonnes de cacao pour la campagne 2019-2020 (ICCO, 2019).

1-2-2-3- Groupe des *Trinitario*

L’appellation *Trinitario* est réservée aux formes hybrides de cacaoyers. Ces cacaoyers importés de Trinidad au Venezuela au cours du XIX^{ème} siècle constituaient le premier exemple typique. Les *Trinitario* sont donc des hybrides entre les *Forastero* amazonien et les *Criollo* (Figure 1). La première hybridation entre ces deux groupes s’est réalisée naturellement à Trinidad. Ils représentent 10 à 15 % de la production mondiale de cacao (Herman *et al.*, 2010). Les caractères botaniques des *Trinitario* sont difficiles à définir. Ce sont ceux d’une population très polymorphe où l’on peut observer tous les types intermédiaires entre les *Forastero* d’une part et les *Criollo* d’autre part (Braudeau, 1969).



a- Cabosse de type *Criollo*



b- Cabosse de type *Forastero*



c- Cabosse de type *Trinitario*

Figure 1 : Différents types de cabosses mûres de cacaoyer

(Photos: Ouattara Adama, 2018)

1-3- Morphologie et biologie du cacaoyer

Le cacaoyer est un arbuste. Il peut atteindre 5 à 7 m de hauteur en moyenne (Figure 2). Cependant, lorsqu'il pousse à l'état sauvage dans la forêt, il peut dépasser cette hauteur. Sa taille et son développement dépendent beaucoup de l'environnement (Braudeau, 1969).

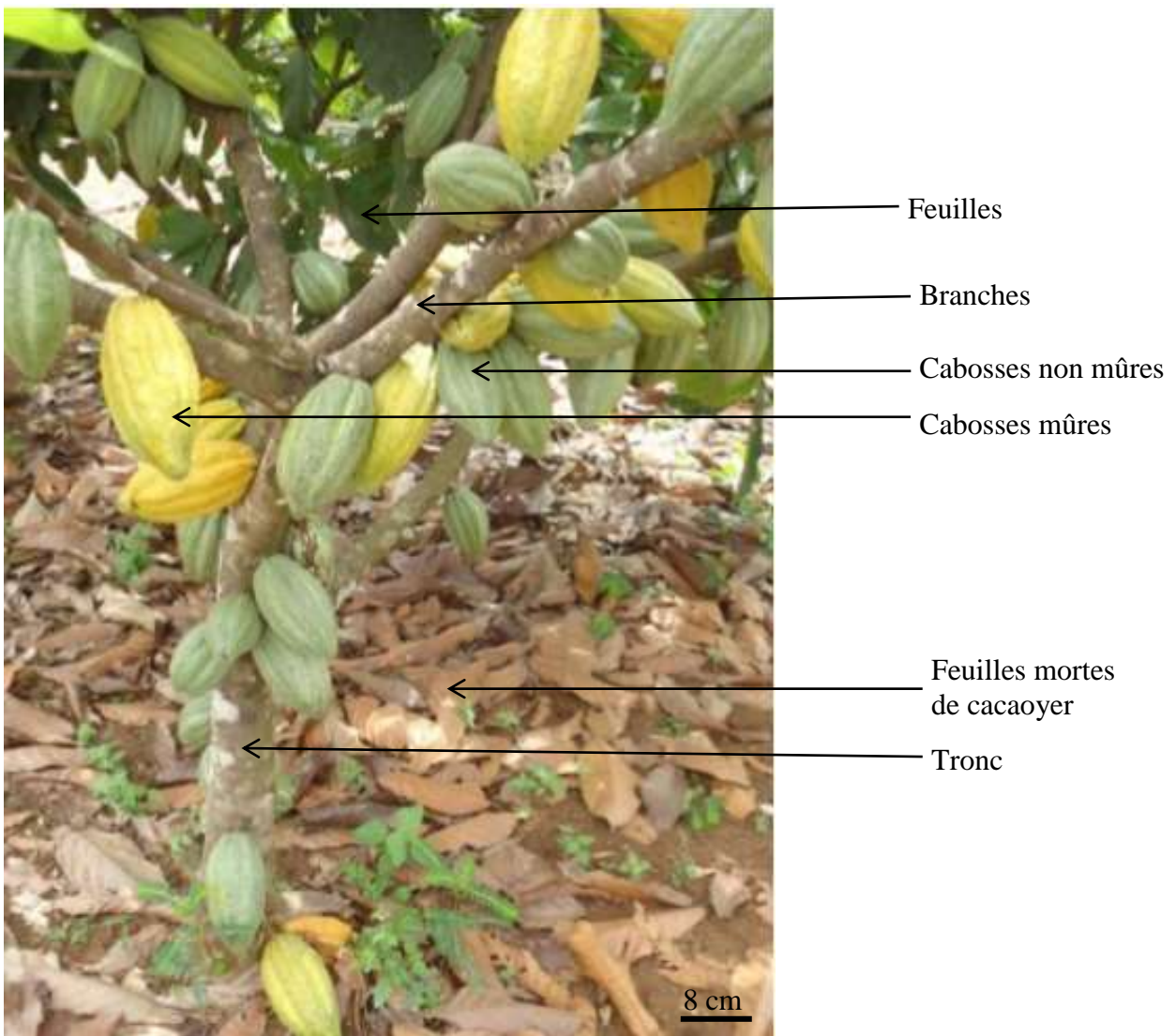


Figure 2 : Cacaoyer en production à la station CNRA de Divo (Tahi *et al.*, 2017)

1-3-1- Système racinaire

Les cacaoyers provenant de semences sont constitués d'une part, d'un pivot pénétrant profondément dans le sol et d'autre part d'une couronne de racines latérales superficielles (Figure 3). A dix ans, le pivot atteint pratiquement son développement définitif. Sa longueur moyenne varie de 0,80 m à 1,50 m et peut atteindre 2 m. Les racines latérales sont abondantes chez le jeune cacaoyer et se répartissent dans la couche humifère superficielle du sol. Les cacaoyers qui ont été produits à partir de boutures dans le cas d'un matériel végétal clonal, n'émettent que des racines latérales. Cependant, une ou plusieurs de ces racines peuvent se développer verticalement et former un ou des petits pivots (Braudeau, 1969). L'absence de pivot chez les jeunes cacaoyers provenant de boutures ralentit leur développement végétatif et les rend plus sensibles à la sécheresse (Braudeau, 1969).

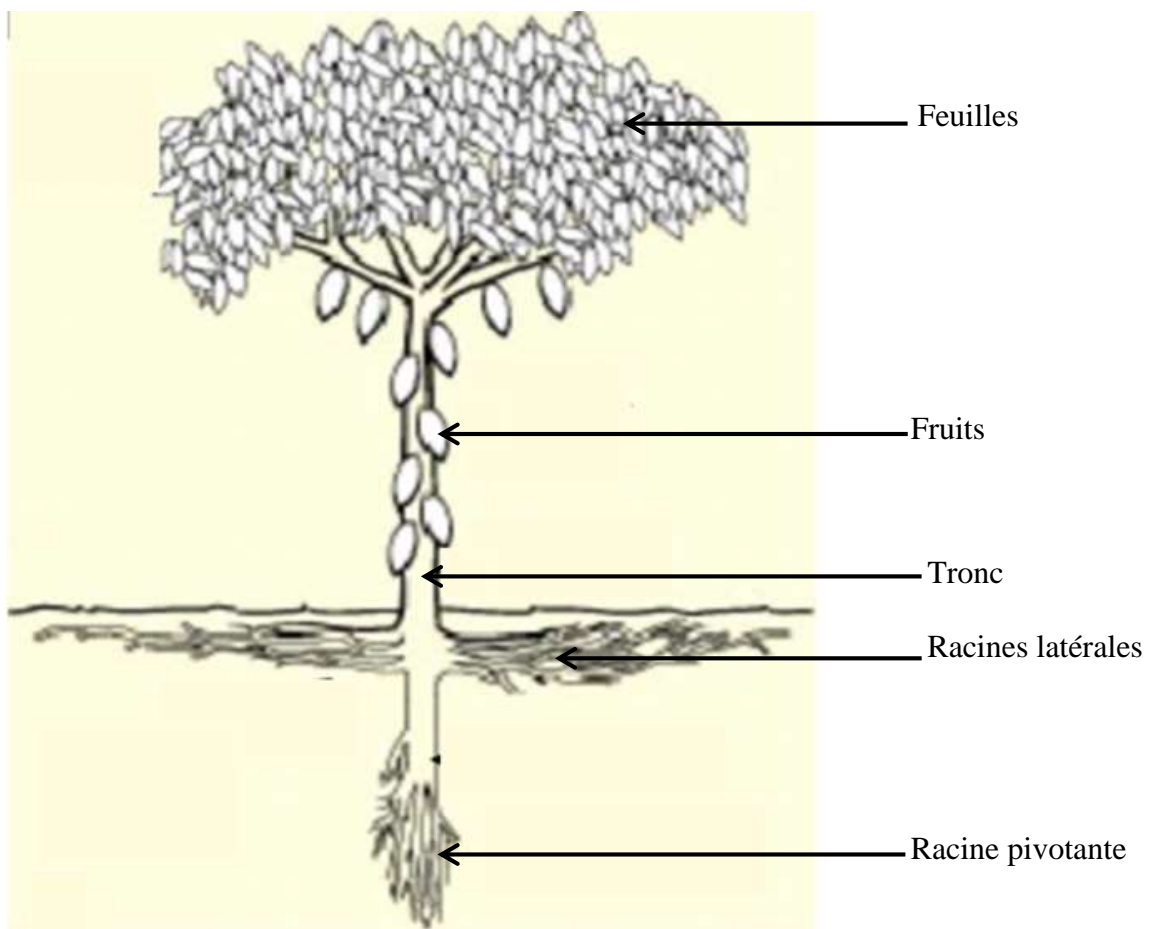


Figure 3 : Architecture générale du système racinaire d'un cacaoyer adulte (D'après Demol, 2002)

1-3-2- Parties aériennes

1-3-2-1- Tronc

Après l'apparition des premières feuilles sur le jeune semenceau, le bourgeon terminal poursuit son développement et la tige croît verticalement (orthotropie) jusqu'à l'âge de 18 mois. L'extrémité de la tige présente alors l'aspect caractéristique d'un massif de 5 bourgeons axillaires (Figure 2 et Figure 3) disposés en verticille et dont le développement donne naissance à cinq branches qui forment la couronne (Demol, 2002). Le tronc est généralement droit avec une écorce peu épaisse de couleur brun grisâtre. Son diamètre est de l'ordre de 20 cm ou plus.

1-3-2-2- Feuilles

Les feuilles du cacaoyer sont persistantes caractérisées par une grande taille et une forme simple, lancéolées ou oblongues selon le génotype, pointues et penninervées. L'implantation des feuilles se fait selon une phyllotaxie distique sur les axes plagiotropes et rayonnante sur l'axe orthotrope (Braudeau, 1969). Les feuilles juvéniles du cacaoyer sont molles et tendres avec une coloration variant du vert pâle à diverses tonalités de rouge selon le génotype et la quantité d'anthocyanes qu'elles contiennent. Cependant elles deviennent vertes à l'état adulte. Elles mesurent de 20 à 30 cm de long pour une largeur de 7 à 12 cm. Les stomates sont répartis sur la face inférieure des feuilles et leur densité est directement liée à l'intensité lumineuse à laquelle est soumise la feuille (Demol, 2002, Herman *et al.*, 2010).

1-3-2-3- Inflorescences et fleurs

Les inflorescences sont portées sur le tronc (cauliflorie) ou sur les branches maîtresses (ramiflorie). La fleur de cacaoyer est de petite taille (diamètre variant de 0,5 à 1 cm) et supportée par un pédoncule de 1 à 3 cm. Elle est hermaphrodite, régulière et pentamère. D'après Demol (2002), elle est composée de cinq sépales blancs ou teintés de rose, soudés à leur base formant le calice et de cinq pétales constituant la corolle, alternant avec les sépales. Les pétales ont une forme très particulière. Très étroits à la base, ils s'élargissent et deviennent concaves pour former un petit capuchon (la cuculle) de couleur blanche, bordée intérieurement de deux nervures violettes. Ces nervures ont une ouverture orientée vers l'axe de la fleur et une partie supérieure qui est prolongée par une ligule relativement large, lancéolée, de couleur jaunâtre, complètement retournée vers l'extérieur de la fleur (Braudeau, 1969). L'ovaire supère, comprend cinq loges contenant chacune

six à dix ovules disposés autour de l'axe central de l'ovaire. Le style est tubulaire, terminé par cinq stigmates. L'androcée est composé de cinq étamines stériles.

1-3-2-4- Fruits

Le fruit du cacaoyer est appelé « chérelle » pendant les 5 à 6 mois de sa croissance, puis « cabosse » lorsqu'il atteint sa taille mature. Il est indéhiscent et ressemble à une baie. Les graines, couramment appelées fèves, sont entourées d'une pulpe mucilagineuse et imbriquées dans une seule cavité qui renferme en moyenne 30 à 40 fèves disposées selon 5 rangées longitudinales. Le taux de remplissage des cabosses est en réalité extrêmement variable et dépend du taux de fécondation de l'ovule et des caractéristiques variétales de la plante. En particulier, le dessèchement des jeunes fruits (wilt) affecte 20 à 90 % des chérelles à la fin de leur deuxième mois d'existence. Ce dessèchement a pour origine des mécanismes de régulation physiologique tels que le seuil de flétrissement différentiel, l'incompatibilité et la limitation de la fructification par effet de compétition entre fruits (Braudeau, 1969).

1-4- Ecophysiologie du cacaoyer

1-4-1- Exigences climatiques

Le cacaoyer est un arbuste de sous-bois qui occupe, dans son habitat naturel, les étages inférieurs des forêts humides d'Amérique tropicale, entre 18° de latitude Nord et 15° de latitude Sud, à des altitudes allant du niveau de la mer jusqu'à 1250 m (Braudeau, 1969 ; Läderach *et al.*, 2013). Le climat intervient directement sur la croissance et le développement du cacaoyer. Les principaux facteurs climatiques agissant sur le cacaoyer sont la température, la pluviométrie, l'humidité atmosphérique et la lumière. En effet, la température et les précipitations ont une grande influence sur les rendements du cacaoyer (Zuidema *et al.*, 2005).

Le cacaoyer est cultivé dans des régions où les températures varient en moyenne entre 18 à 21°C minimums et 30 à 32°C maximums (van Vliet & Giller, 2017). Une pluviosité annuelle idéalement située entre 1500 et 2000 mm et qui ne descend pas en dessous de 100 mm par mois est la plus favorable (Zuidema *et al.*, 2005). Selon Braudeau (1969), le cacaoyer exige une humidité relative moyenne annuelle comprise entre 70 et 100 % ainsi qu'un couvert végétal le protégeant de l'insolation directe et de l'évaporation. Ces caractéristiques ne lui confèrent pas la qualité de plante d'ombrage (van Vliet & Giller, 2017).

1-4-2- Sols favorables à la cacaoculture

Tous les sols ne sont pas favorables à la culture du cacaoyer. Le cacaoyer requiert des sols profonds, riches en matière organique et en éléments minéraux (Kassin *et al.*, 2012). Les sols favorables au cacaoyer doivent être aérés et bien drainés avec une profondeur minimale de 1,5 m et une structure homogène permettant une bonne rétention en eau et une texture de préférence argilo-sableux (Koko, 2014). La majorité des sols de la zone cacaoyère ivoirienne est ferrallitique et caractérisée par une somme de bases échangeables inférieure à 8 méq / 100 g de sol, un taux de saturation du complexe adsorbant inférieur à 80 % (van Vliet *et al.*, 2017). Les sols favorables à la culture du cacaoyer doivent avoir un pH proche de la neutralité (pH compris entre 6,5 et 7), une bonne teneur en matière organique dans la couche superficielle et un équilibre ionique des principaux éléments nutritifs notamment les macronutriments (Ca, Mg, N, P, K, S) et les micronutriments : Fe, Mn, Zn, Cu, B, Ni (Loureiro *et al.*, 2016 ; van Vliet *et al.*, 2017 ; Assa *et al.*, 2019). Les carences et les déficiences minérales entraînent des anomalies foliaires chez le cacaoyer notamment, une réduction de la taille des feuilles et un jaunissement du limbe (Braudeau, 1969) qu'il ne faut pas confondre avec les symptômes provoqués par les maladies virales et fongiques.

1-5- Importance de la cacaoculture

1-5-1- Importance nutritionnelle et médicinale du cacao

Le cacao contient beaucoup de nutriments dont les antioxydants (flavonoïdes) qui contribuent au bon fonctionnement du système cardiovasculaire (Katz *et al.*, 2011 ; Grassi *et al.*, 2013), la théobromine (3-7-diméthylxanthine) et la caféine (1-3-7-triméthylxanthine) qui ont une action tonifiante. La théobromine stimule le système nerveux et facilite l'effort musculaire, tandis que la caféine accroît la vigilance, augmente la résistance à la fatigue et la période d'efficacité intellectuelle (Scholey & Owen, 2013 ; Sumiyoshi *et al.*, 2019). Sa teneur en magnésium est excellente pour les sportifs et même pour les non sportifs carencés. Le chocolat favorise le transit intestinal grâce aux polyphénols et aux fibres qu'il contient (Ruzaidi *et al.*, 2008). Dans la pharmacopée, le cacao ou ses dérivés servent à mettre au point des produits efficaces contre plusieurs affections (Maskarinec *et al.*, 2018). Il peut s'agir des pommades contre les brûlures, les douleurs rhumatismales, les crampes musculaires, les cicatrices, les peaux fendillées, les gerçures (des lèvres et des seins), des produits cosmétiques (vaseline), des onguents pour frictions localisées et des suppositoires médicamenteux (Katz *et al.*, 2011 ; Maskarinec *et al.*, 2018).

1-5-2- Importance de la cacaoculture dans l'économie ivoirienne

Le cacao est probablement plus connu aujourd'hui comme la matière première du chocolat, lequel absorbe environ 90 % de la production mondiale de cacao. En moyenne, près de 3 millions de tonnes de cacao en fèves sont produites chaque année. Les ressources procurées par la filière cacao en Côte d'Ivoire contribuent à près de 15 % du PIB (ICCO, 2000) et représente entre 37 à 40 % des recettes d'exportation du pays (Friedel *et al.*, 2016). La cacaoculture est pratiquée dans la moitié sud de la Côte d'Ivoire sur une superficie d'environ 1.777.550 hectares. Ce sont 800 000 à 1,3 million d'exploitations qui participent à la production de cacao avec environ 8 millions de personnes qui vivent de cette culture (Friedel *et al.*, 2016). La filière cacao occupe 40 % des activités du secteur bancaire du pays (Keho *et al.*, 2008).

1-5-3- Importances écologiques des agroforêts à base de cacaoyers

Les agroforêts à base de cacaoyers jouent un rôle écologique très important dans l'aération de l'air, créant ainsi des microclimats favorables à la conservation de la biodiversité, des sols et de l'eau. Ces agroforêts participent à la régulation des populations de bioagresseurs et d'adventices, à la capture du carbone atmosphérique et à la mitigation du changement climatique (Schroth & Harvey, 2007 ; Somarriba & Beer, 2011).

1-6- Maladies du cacaoyer

Les maladies sont la principale contrainte biologique de la cacaoculture dans le monde (End *et al.*, 2014). Elles causent d'énormes pertes de production chaque année (Ploetz, 2016).

1-6-1- Maladies virales

Diverses maladies virales ont été observées sur les cacaoyers, parmi celles-ci le swollen shoot est la plus connue en Afrique de l'ouest (Ende *et al.*, 2014).

1-6-1-1- Swollen shoot

Le swollen shoot est la principale maladie d'origine virale connue chez le cacaoyer. Le virus responsable du swollen shoot est le *Cacao swollen shoot virus* ou CSSV appartenant au genre *Badnavirus*. Cette affection est caractérisée par un gonflement des rameaux et des racines (Figure 4). Les symptômes sur les jeunes feuilles sont des bandes rouges ou un jaunissement le long des nervures (Muller, 2008). Ce virus provoque également, des mosaïques avec une décoloration le long des nervures les feuilles matures et une réduction de la taille des cabosses (Kouakou *et al.*,

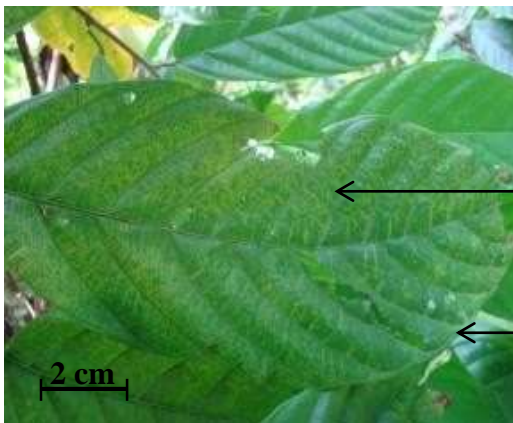
2011). Le swollen shoot est transmis par au moins 14 espèces de cochenilles du genre *Hemiptera* sp. (End et al., 2014). Les dégâts occasionnés par cette maladie sont importants et conduisent à la mort progressive des plantes infectées. Elle peut causer des pertes allant de 30 à 40 % de la production (ICCO, 2015). Cette maladie se développe de manière endémique en Afrique de l'Ouest (Dzahini-Obiatay et al., 2006). En Côte d'Ivoire, les dégâts les plus importants ont été enregistrés dans les zones de Sinfra et Bouaflé (Kouakou et al., 2011).



a- Symptômes du swollen shoot sur tige de cacaoyer (Gonflement des tiges)

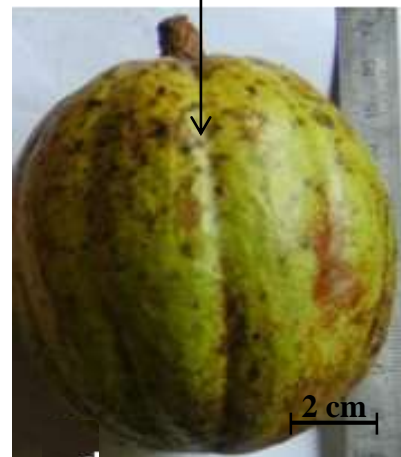


b- Symptômes du swollen shoot sur les racines du cacaoyer (Gonflement des racines)



c- Symptômes du swollen shoot sur feuille mature

Cabosse de taille anormale



d-Symptômes du swollen shoot sur cabosse d'un cacaoyer infecté

Figure 4 : Symptômes de la maladie du swollen shoot sur les différentes parties cacaoyer au champ (Kouakou *et al.*, 2011)

1-6-1-2- Nécrose du cacaoyer

Les nécroses du cacaoyer sont causées par un virus *Cocoa necrosis virus* ou CNV du genre des *Nepovirus*. Les cacaoyers infectés présentent une nécrose des nervures. Cette nécrose apparaît le long de la nervure centrale et des nervures secondaires. Également aux premiers stades de l'infection, il est observé un dépérissement terminal des tiges. Aucun gonflement ne se développe sur les racines ou sur les tiges. Cette maladie est présente au Nigeria et au Ghana (End *et al.*, 2014). La transmission du *Cocoa necrosis virus* se fait probablement par un nématode vecteur. Le virus est facilement transmis par voie mécanique et par greffe mais pas par les cochenilles. L'éradication des arbres affectés a donné un bon contrôle de la mortalité (End *et al.*, 2014).

1-6-1-3- Virus de la mosaïque jaune du cacaoyer

Le virus de la mosaïque jaune du cacaoyer du genre des *Tymovirus* a été décrit seulement en Sierra Leone (End *et al.*, 2014). Les plantes infectées présentent des zones jaunes visibles sur les feuilles. Ce virus n'induit aucun gonflement dans les tiges ou les racines. Il ne se transmet pas par les semences mais facilement transmis par inoculation de sève par le biais de nombreuses espèces herbacées (End *et al.*, 2014).

1-6-2- Maladies fongiques

Les principales maladies fongiques du cacaoyer sont le balai de sorcière, la moniliose, le syndrôme de dépérissement vasculaire (VSD), les pourridiés et la pourriture brune des cabosses

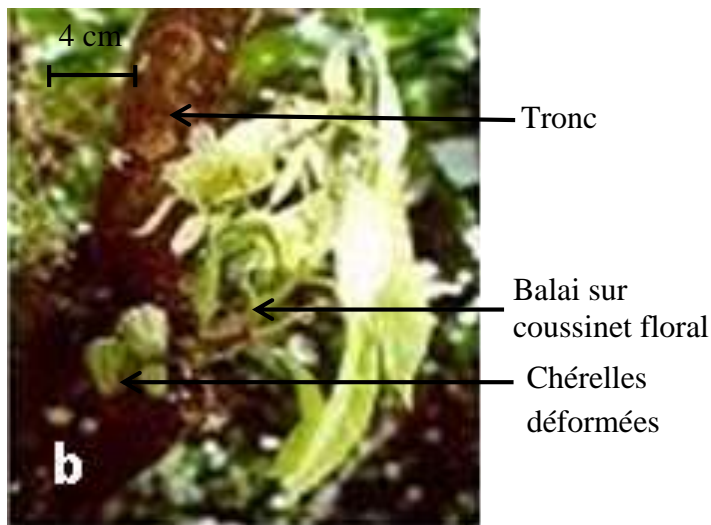
1-6-2-1- Balai de sorcière

Le balai de sorcière est une maladie essentiellement présente en Amérique du sud (Kelly *et al.*, 2009 ; End *et al.*, 2014). Elle provoque d'importantes pertes de production allant de 30 à 100 % (Vos *et al.*, 2003). Le parasite responsable de cette maladie est *Moniliophthora perniciosa* (End *et al.*, 2014 ; Mondego *et al.*, 2016). Il s'attaque à tous les tissus méristématiques en développement (Figure 5) dont les feuilles, les jeunes pousses, les bourgeons floraux, et les chérelles. Les fruits attaqués se développent normalement. Mais à l'intérieur des cabosses, les fèves pourrissent et sont transformées en une masse brune plus ou moins liquéfiée (Barau *et al.*, 2015). *M. perniciosa* induit de nombreux symptômes sur les pousses végétatives, les fleurs, les coussinets floraux et les cabosses. Cependant, l'hypertrophie de la croissance des méristèmes végétatifs infectés (balais) reste

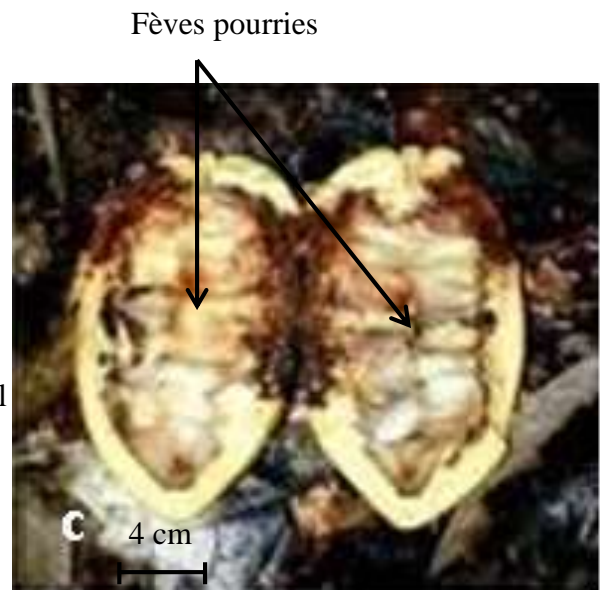
le symptôme principal de la maladie du balai de sorcière (End *et al.*, 2014). La lutte contre le balai de sorcière est essentiellement chimique avec l'emploi de fongicides (Thomazella *et al.*, 2012). Toutefois, la sélection de variétés ou de clones résistants à la maladie reste le moyen de lutte le plus efficace (End *et al.*, 2014).



a- Balai végétatif terminal



b- Coussinet floral malade

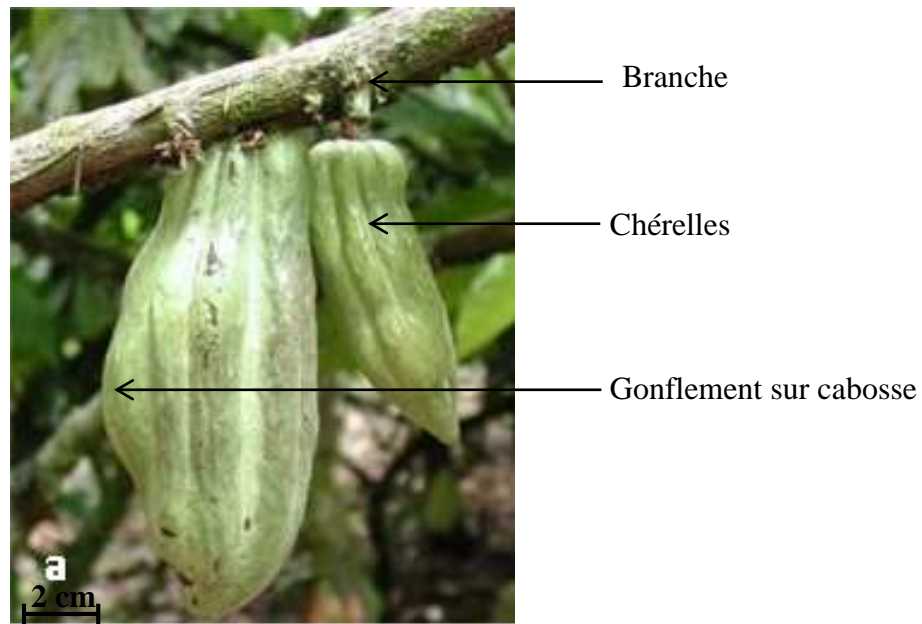


c- Lésion sur cabosse

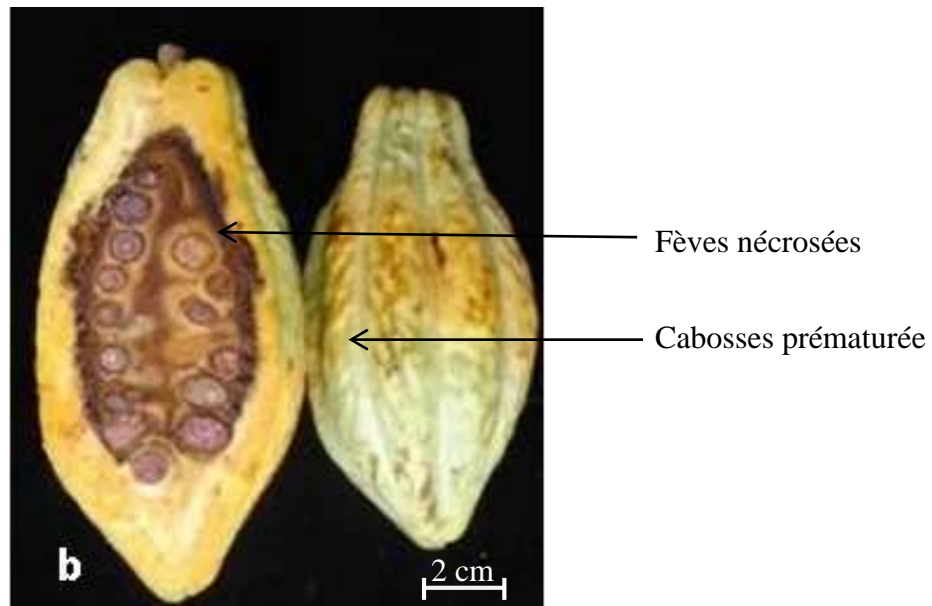
Figure 5 : Symptômes du balai de sorcière au champ sur le cacaoyer (End *et al.*, 2014)

1-6-2-2- Moniliose

La moniliose est présente en Colombie et en Equateur, à l'ouest du Venezuela, au Pérou, à Panama, au Costa Rica, au Nicaragua, au Honduras, au Guatemala, au Belize et au Mexique (Phillips-Mora *et al.*, 2007). Elle a récemment été décrite au Salvador (Phillips-Mora *et al.*, 2010). Elle peut provoquer des pertes allant de 60 à 90 % de la production. Elle représente donc une menace pour la production cacaoyère. Cette maladie est due à un champignon *Moniliophthora roreri* qui attaque les jeunes cabosses du cacaoyer (Kelly *et al.*, 2009 ; End *et al.*, 2014). En conditions naturelles, la maladie affecte seulement les cabosses. L'infection peut se produire dès les tous premiers stades de développement et la sensibilité décroît avec l'âge des cabosses (Phillips-Mora *et al.*, 2010). Les premiers symptômes se caractérisent par un ou plusieurs œdèmes apparaissant sur la cabosse (Figure 6 a) ou de petites lésions gorgées d'eau, qui s'élargissent en zones nécrosées avec une délimitation irrégulière. Un mycélium fongique blanc recouvre le secteur infecté en une période de trois à cinq jours, avec la formation d'un tapis prenant une couleur crème qui libérera des spores brunes claires. Les cabosses attaquées se développent normalement, mais à l'intérieur de ces cabosses, les fèves pourrissent et sont transformées en une masse brune plus ou moins liquéfiée (Figure 6 b). Les cabosses malades sèchent sur les arbres et se recouvrent des fructifications du champignon (Kelly *et al.*, 2009). Les traitements fongicides permettent de lutter contre cette maladie.



a- Gonflements caractéristiques sur jeunes cabosses

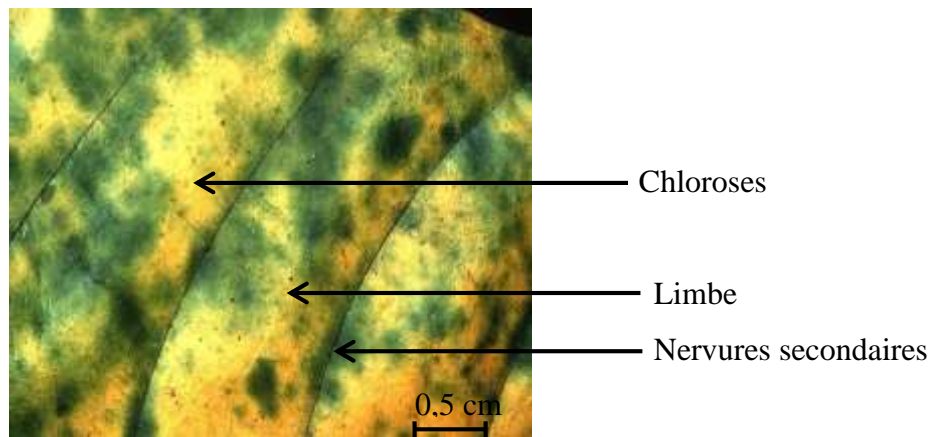


b- Nécrose des fèves et maturation prématurée des cabosses infectées

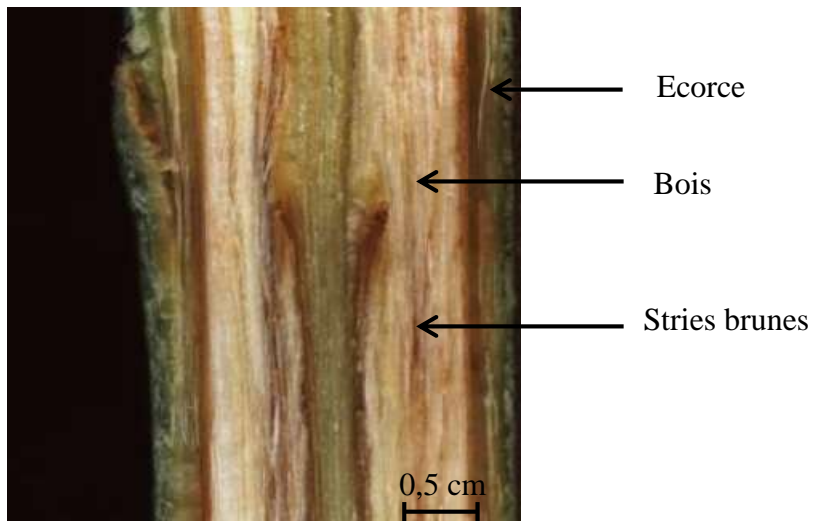
Figure 6 : Symptômes de moniliose sur cabosses de cacaoyer (End *et al.*, 2014)

1-6-2-3- Syndrome de dépérissement vasculaire

Le syndrome de dépérissement vasculaire est causé par le champignon *Onchobasidium theobromae* (Guest & Keane, 2007). C'est un champignon systémique du xylème. L'infection par les hyphes du pathogène peut être observée dans les vaisseaux du xylème des tiges et des feuilles, où le xylème infecté est décoloré par des stries brunes aisément visibles quand on fend les tiges (Guest & Keane, 2018). On observe aussi des faisceaux vasculaires noircis sur des pétioles isolés d'arbres infectés. Un autre symptôme caractéristique des tiges infectées est la décoloration rapide du cambium qui devient brun rouille si on l'expose à l'air libre après avoir enlevé l'écorce comme le montre la Figure 7 (End *et al.*, 2014).



a- Chlorose foliaire



b- Symptôme du VSD sur tige de cacaoyer

Figure 7 : Symptôme du syndrome de dépérissement vasculaire (VSD) sur le cacaoyer (End *et al.*, 2014)

1-6-2-4- Pourridiés

Les pourridiés sont des champignons qui s'attaquent aux racines du cacaoyer et peuvent dans certaines régions provoquer des dommages très importants. En Afrique, les plus répandus sont *Armellariel lamellea* et *Fomes lignosus* dont les attaques provoquent respectivement un éclatement du collet et une inclinaison des cacaoyers. Le mycélium propage la maladie le long des racines et par contact des racines malades à des racines saines. Un arbre atteint est irrémédiablement perdu. D'où la difficulté de la lutte contre les pourridiés. Il est conseillé d'en tenir compte dans le choix du terrain et d'effectuer un dépistage soigneux des arbres atteints au cours des premières années de plantation (End *et al.*, 2014).

1-6-2-5- Pourriture brune des cabosses

La pourriture brune des cabosses, curieusement dénommée «black pod» par les auteurs anglophones (ce qui peut conduire à une confusion avec la pourriture molle des cabosses due à *Botryodiplodia theobromae*) est la plus répandue de toutes les maladies du cacaoyer (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016 ; Ploetz, 2016). Les agents responsables sont du genre *Phytophthora*, qui peuvent infecter tous les organes du cacaoyer (Acebo-Guerrero *et al.*, 2011). Les infections des feuilles provoquent des dégâts peu importants contrairement aux attaques du tronc ou des cabosses qui provoquent des pertes très importantes. Les infections du tronc ou le chancre du tronc sont à l'origine de dommages considérables en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016). En Afrique et en Amérique Latine, cette manifestation est rare. En revanche, les attaques des fruits ou la pourriture brune des cabosses causent des dégâts qui, bien que variant d'un pays à l'autre, sont très importants (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016). Les pertes annuelles dues à la pourriture brune des cabosses sont estimées à 30 % de la récolte mondiale, ce qui représente une perte d'environ 3,8 milliards de dollar américains par an pour les producteurs de cacao du monde entier (Guest, 2007 ; Ploetz, 2016). Ces pertes sont estimées à plus de 44 % en Côte d'Ivoire (Pohé *et al.*, 2013 ; Coulibaly, 2014 ; Coulibaly *et al.*, 2018). Ailleurs, en Afrique ces pertes sont estimées de 30 à 50 % au Ghana (Akrofi, 2015 ; Ploetz, 2016), 50 à 80 % au Cameroun, au Gabon et en Guinée équatoriale (Deberdt *et al.*, 2008) où dominent les infections dues à l'espèce *Phytophthora megakarya* et 20 à 100 % au Nigeria (Ploetz, 2016 ; Etaware & Adedeji, 2019). En Amérique latine, les dégâts peuvent aussi être importants sur le plan économique, 20 à 30 % au Brésil, 20 % au

Venezuela, 20 à 40 % au Mexique voire 100 % au Pérou. En Asie du Sud-Est les pertes sont estimées de 15 à 20 % (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016).

Chapitre 2 : Genre *Phytophthora*

2-1- Taxonomie

Jusqu'à un passé récent, les parasites du genre *Phytophthora* étaient considérés comme des champignons en raison de similitudes phénotypiques et biochimiques. Cependant, du fait de l'existence de cellules biflagellées au cours de leur cycle de vie, les *Phytophthora* ont récemment été rattachés aux Straménopiles ou Hétérokontes (Dick, 2001 ; Baldauf, 2008 ; Burki, 2014 ; Thines, 2014).

2-1-1- Règne

Le terme « *Phytophthora* » est composé de deux racines grecques dont « *phyton* », une plante et « *phthora* », destruction (Blackwell, 1949). Les *Phytophthora* sont donc des destructeurs de végétaux et englobent plusieurs genres d'oomycètes phytopathogènes (Surujdeo-Maharaj *et al.*, 2016 ; McCarthy & Fitzpatrick, 2019). Traditionnellement, ils étaient placés dans le règne des Mycètes et dans la division des Mastigomycètes avec les Chytridiomycètes et les Hypochytriomycètes, à cause de leur production de spores mobiles (biflagellées chez les Oomycètes), leur mode d'absorption des nutriments et leur morphologie en thalle (McCarthy & Fitzpatrick, 2019). Bien qu'ils partagent de nombreuses caractéristiques écologiques et biologiques avec les vrais champignons, leur génétique et leurs mécanismes de reproduction les distinguent (Erwin & Ribeiro, 1996). Le récent placement de *Phytophthora* dans le règne des Stramenopiles a été soutenu par des caractéristiques distinctes telles que la variation des voies métaboliques, la présence de β -glucanes plutôt que de chitine dans les parois cellulaires (Bartnicki-Garcia & Wang 1983), la production de zoospores hétérokontes mobiles (Desjardins *et al.*, 1969) et la prédominance du stade diploïde dans leur cycle biologique (Erwin & Ribeiro, 1996 ; Van der Auwera *et al.*, 1995 ; McGowan *et al.*, 2019).

2-1-2- Ordre des Pythiales

L'Ordre des Pythiales comprend une seule famille : les Pythiaceae. Cette famille regroupe entre autres les genres *Phytophthora* et *Pythium* (Riethmüller *et al.*, 2002) . Ces deux genres partagent des caractéristiques morphologiques et une gamétogénèse similaires. Cependant, ils se distinguent par la formation de leurs zoospores. Chez le genre *Phytophthora*, les zoospores se différencient

dans le sporocyste avant leur expulsion dans l'environnement. Chez le genre *Pythium*, les zoospores sont relâchées dans une vésicule avant leur différenciation. De plus, le genre *Phytophthora* forme des sporocystes de formes différentes sur des sporangiophores distincts, et plusieurs espèces possèdent des gamétocystes mâles (anthéridies) amphigynes plutôt que paragynes (Brasier & Hansen, 1992 ; Riethmüller *et al.*, 2002).

2-1-3- Genre *Phytophthora*

Rosenbaum et Tucker furent les premiers à bâtir la classification du genre *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000). Ces premières classifications ont été reprises par Waterhouse *et al.* (1983). Ces derniers assigné les espèces à l'un ou l'autre des 6 groupes morphologiques selon la nature des sporocystes (papillées, semi-papillées ou non-papillées), la forme de l'attachement de l'anthéridie (amphigyne ou paragyne) et l'homothallisme. Sur la base de séquences ITS, le genre a été jusqu'alors divisé en 8 clades distincts (Cooke *et al.*, 2000). L'afflux de données génomiques sur le genre *Phytophthora* suite au séquençage des génomes complets des espèces *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora sojae* et *Phytophthora infestans* a permis de mieux comprendre l'histoire évolutive du genre. Il a été ajusté à 10 clades (Attard *et al.*, 2008; Blair *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2013). Les espèces *Phytophthora megakarya* et *Phytophthora palmivora*, sont dans le clade 4, tandis que l'espèce *Phytophthora capsici* est dans le clade 2 (Figure 8).

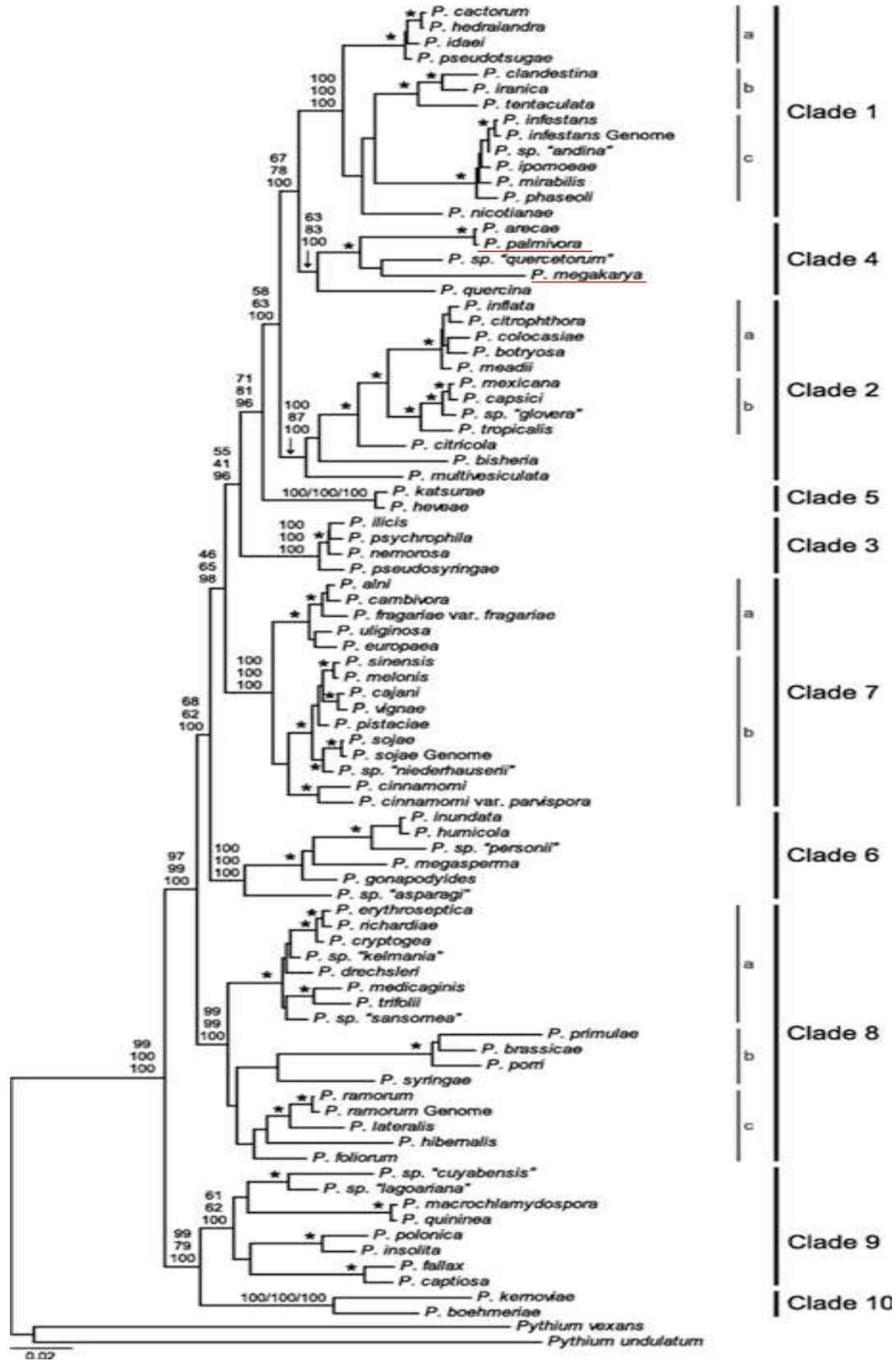


Figure 8 : Arbre phylogénétique du genre *Phytophthora* spp., (Blair et al., 2008)

2-2- Cycle biologique du genre *Phytophthora*

Le genre *Phytophthora* a deux modes de reproduction : Il s'agit de la reproduction sexuée et de la reproduction asexuée (Figure 9). Ces deux modes de reproduction leur donne l'avantage de produire un grand nombre de générations en une durée courte (Blair *et al.*, 2008). Les organes reproducteurs se forment généralement lorsque le mycélium végétatif a atteint un certain degré de développement et accumule une réserve alimentaire suffisante. Ce moment coïncide souvent avec l'épuisement du milieu, mais d'autres conditions telles que la température et la lumière influencent également le phénomène (Meulemans, 1989).

La reproduction sexuée se fait par l'union d'une anthéridie (organe mâle) et d'une oogone (organe femelle). Ce mode de reproduction sexuée est l'oogamie siphonogame. Dans ce cas l'anthéridie se fixe sur l'oogone de façon paragyne ou amphigyne (Erwin & Ribeiro, 1996 ; Pohé, 2012). Dans le cas de l'amphigynie, le filament oogonial est inséré dans l'anthéridie comme chez *Phytophthora heveae* et *Phytophthora Katsurae*. Dans le cas de la paragynie, l'anthéridie est simplement colée contre la paroi de l'oogone, c'est le cas chez *Phytophthora cactorum*. Il en résulte des oospores sphériques de teinte jaune-claire, à paroi assez épaisse (1 à 2 µm). Les oospores sont des organes de dormance qui peuvent constituer une réserve de variabilité génétique dont les limites des potentialités ne sont pas bien connues (de Vallavieille, 1983).

La reproduction asexuée se fait par la formation des sporocystes et de leur germination (Duniway, 1983). La germination des sporocystes suit deux voies. La première nécessite la présence d'eau et aboutit à la libération des zoospores biflagellées. Celles-ci vont nager dans les couches d'eau avant de s'enkyster et émettre plus tard un tube germinatif (Mac Donald & Duniway, 1978). En absence d'eau, intervient la deuxième voie, les sporocystes subissent une germination dite directe par opposition à la première, celle de la libération des zoospores, appelée indirecte. Cette deuxième voie permet aux sporocystes d'émettre directement un tube germinatif (Duniway, 1983).

La dissémination des espèces du genre *Phytophthora*, qu'elles soient aériennes ou telluriques, est essentiellement assurée par les organes de reproduction asexuée qui sont principalement à l'origine des épidémies. Les facteurs climatiques conditionnant la formation, la maturation et la germination de ces organes, confinent généralement leur activité pathogène à une période particulière de l'année, sur les plantes cultivées au champ (Zentmyer, 1980). En conditions climatiques défavorables ou en l'absence d'hôte sensible, il peut y avoir production de chlamydospores.

Ces spores asexuées sont des organes de conservation à parois épaisses, pouvant se maintenir dans le sol pendant six ans (Zentmyer, 1980). Après la germination, soit la spore redonne directement du mycélium, soit elle forme un sporange.

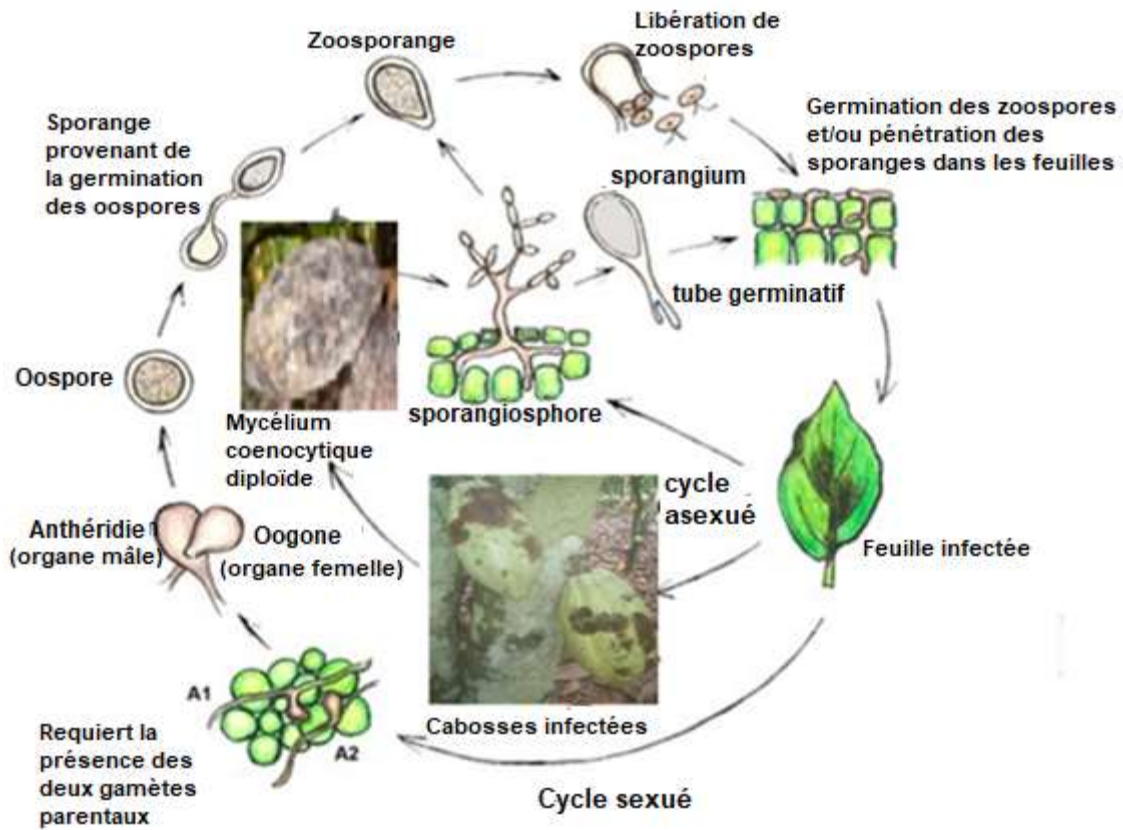


Figure 9 : Cycle biologique de reproduction du genre *Phytophthora* spp., (Schéma adapté de Bengtsson, 2013)

2-3- Mode de pénétration du genre *Phytophthora* dans les organes du cacaoyer

Le genre *Phytophthora* attaque les feuilles ou les cabosses à travers l'épiderme de ces organes aériens par la voie d'ouvertures naturelles (stomates, hydathodes, lenticelles, cicatrices d'abscission foliaire), par percement direct de la cuticule ou par des blessures mécaniques induites par les vecteurs (Duhoux & Nicole, 2004). Cependant, cette pénétration à l'intérieur des tissus se fait principalement par les stomates suite à une germination des zoospores qui émettent des tubes germinatifs (Tarjot, 1972 ; Pohé, 2012). Le parasite pénètre toujours à l'intérieur des tissus quelle que soit la sensibilité de la cabosse. Dans le cas d'une cabosse issue d'un clone résistant, la zone de résistance se situe vraisemblablement dans le parenchyme à petites cellules se trouvant dans les couches superficielles de l'épicarpe, immédiatement sous l'épiderme. Cette zone est riche en tannins tels que les composés phénoliques et les peroxydases et pauvre en glucides (Louise *et al.*, 2011 ; Simo *et al.*, 2014 ; Bailey *et al.*, 2016). Chez les clones sensibles, cette zone est riche en glucides et pauvre en composés phénoliques (Ondobo *et al.*, 2014).

2-4- Espèces du genre *Phytophthora* sur le cacaoyer

Plusieurs espèces du genre *Phytophthora* ont été signalées sur le cacaoyer dont *Phytophthora palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora*, *P. tropicalis* (*P. capsici*), *P. heveae*, *P. megasperma*, *P. nicotinae* var. *parasitica*, *P. katsurae*, *P. meadii*, *P. botryosa* (Kroon *et al.*, 2004; SurujdeoMaharaj *et al.*, 2016). Cependant, seules les quatre premières espèces citées ont une importance économique (Ali *et al.*, 2017). En Afrique de l'ouest et centrale, les deux espèces responsables de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer sont *Phytophthora palmivora* et *P. megakarya* (Coulibaly *et al.*, 2013 ; AKrofi, 2015). *Phytophthora megakarya* est endémique en Afrique de l'ouest et plus agressive pouvant provoquer entre 60 et 100 % des pertes de récoltes quand les conditions sont favorables (Opoku *et al.*, 2000). En revanche, *P. palmivora* est présent dans toutes les régions productrices de cacao. Il est moins agressif que *P. megakarya* et peut entraîner des pertes de rendement de 15 à 40 %. Traditionnellement, les espèces pathogènes de *Phytophthora* connues dans le verger ivoirien étaient *P. palmivora* présente à 94 % et *P. affine* (*P. citrophthora*) présente à 5 % (Babacauh, 1980).

2-5- Symptômes de la pourriture brune

Le premier symptôme observé pour toutes les espèces du genre *Phytophthora* sur les cabosses de cacaoyer est l'apparition de petites taches translucides (Coulibaly *et al.*, 2017). Cette apparition des

taches intervient entre 2 et 3 jours après l'infection pour se manifester. Les taches deviennent alors brunes et finissent par s'assombrir (Figure 10). En période d'humidité, les taches se propagent rapidement pour couvrir toute la cabosse entre sept et quatorze jours après l'infection d'un feutrage de mycélium blanc qui révèle la présence du champignon. Après une dizaine de jours, les fruits affectés sont totalement détruits et leurs fèves inutilisables en chocolaterie (Coulibaly *et al.*, 2017). En fin d'évolution, les fruits restent attachés sur l'arbre sous forme momifiée (AKrofi, 2015 ; Bailey *et al.*, 2016).

Le champignon peut se propager par le pédoncule de la cabosse et atteindre le coussinet floral. De là, il pénètre dans l'écorce du tronc ou de la branche où il provoque la formation d'un chancre saignant. C'est une lésion grisâtre ou brun rougeâtre avec des marges brun foncées sur l'écorce et une exsudation de liquide résineux brun rougeâtre généralement à travers les fissures de l'écorce. Après grattage de la lésion, une coloration écarlate distinctement étalée dans les tissus corticaux est observée. Les lésions en expansion limitent l'écoulement de l'eau et des nutriments vers les branches conduisant au flétrissement, à la défoliation et au dépérissement de la plante.

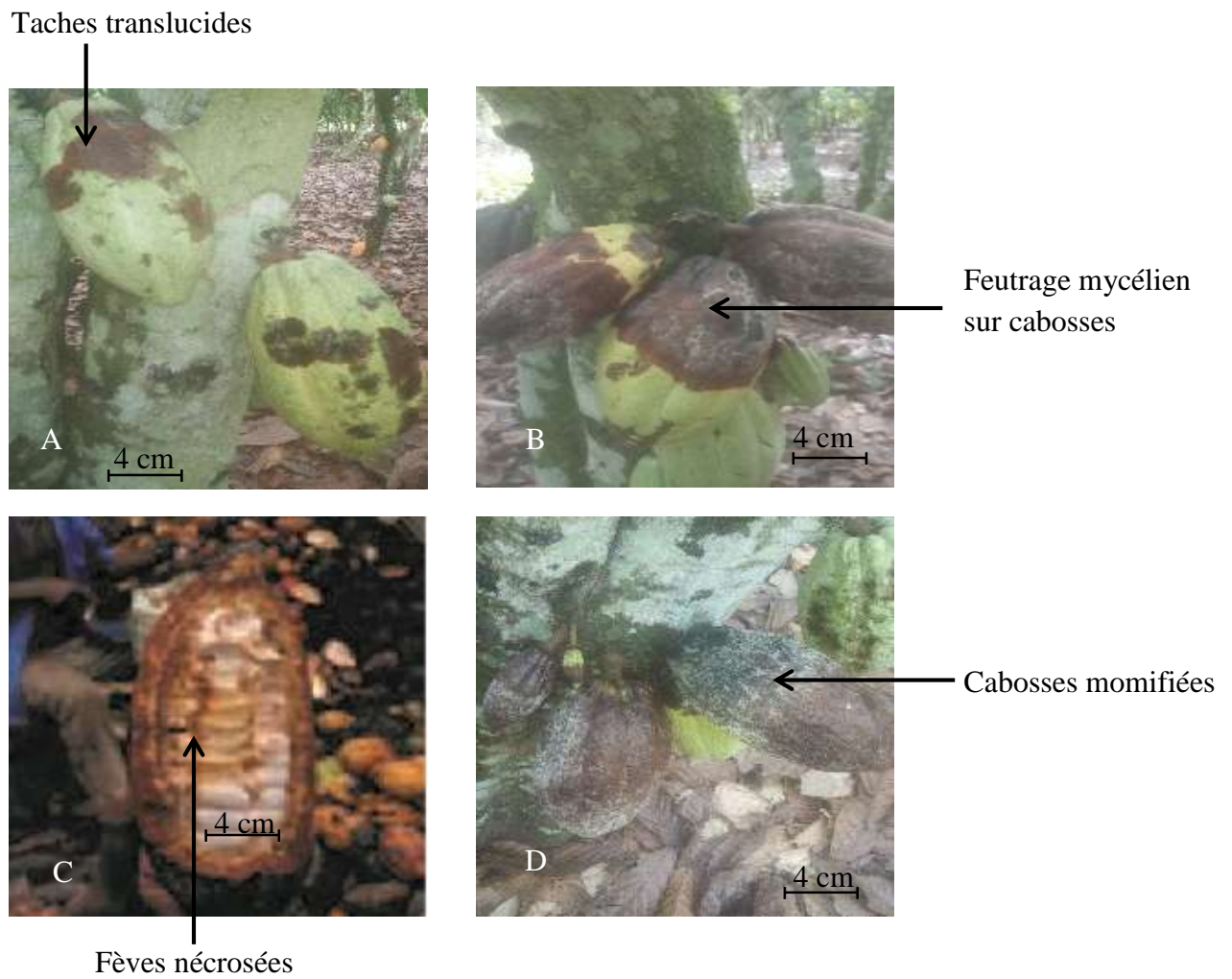


Figure 10 : Evolution de la maladie de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer (CNRA, 2018)

A- Premier stade de l'infection : apparition de taches translucides sur les cabosses de cacaoyer

B-Deuxième stade de l'infection : apparition d'un feutrage mycélien sur les cabosses infectées

C-Stade final de l'infection : Cabosses momifiées sur cacaoyer

D- Fèves nécrosées d'une cabosse de cacaoyer atteinte de pourriture brune

2-6- Méthodes de lutte

La gestion efficace et durable des maladies du cacaoyer nécessite une approche de lutte intégrée combinant plusieurs méthodes de lutte à savoir la mise en quarantaine du matériel végétal, la lutte agronomique, la lutte chimique, la lutte biologique et la lutte génétique (Akrofi, 2015 ; Bailey *et al.*, 2016).

2-6-1- Mise en quarantaine du matériel végétal

L'échange de matériel végétal entre les pays constitue un risque de propagation des agents pathogènes et des ravageurs. La nécessité de minimiser un tel risque est importante étant donné que les principales maladies et ravageurs du cacaoyer sont limités à des emplacements géographiques particuliers. Par exemple l'espèce *Phytophthora megakarya* est actuellement confinée à l'Afrique occidentale et centrale; tandis que le balai de sorcière et la monilliose ne se trouvent qu'en Amérique du sud et centrale. Il est donc essentiel que l'échange de matériel se fasse *via* des stations de quarantaine intermédiaires pour limiter la propagation géographique de ces principales maladies (Akrofi, 2015). L'introduction de matériel végétal en Côte d'Ivoire se fait à travers des stations de quarantaine mises en place par la direction de la protection des végétaux, du contrôle et de la qualité (DPVCQ). Cette structure a pour tâche d'organiser la mise en observation des semences, des plantes ou parties de plantes vertes importées (tubercules, bulbes, rhizomes, rejets, marcottes, boutures, ou bois de greffe, fleurs, fruits, etc...). Elle tient un fichier technique sur la biologie et le comportement des parasites repertoriés dans les stations de quarantaine. Elle est chargée aussi de délivrer des permis d'importation et d'exportation de matériel végétal en Côte d'Ivoire (DPVCQ, 2004).

2-6-2- Lutte agronomique

La lutte agronomique est l'une des premières approches de la lutte contre les maladies des plantes (Akrofi, 2015). Elle consiste à mettre en place des pratiques culturales qui peuvent favoriser la croissance des cultures et freiner le développement des agents pathogènes. Il s'agit de l'ensemble des mesures prophylactiques permettant de créer des conditions défavorables au développement de l'agent pathogène ou de diminuer la pression d'inoculum. Ces mesures prophylactiques peuvent être utilisées en complément à d'autres méthodes de lutte pour renforcer leur efficacité (Akrofi, 2015). Par exemple la récolte sanitaire, qui consiste à débarrasser en début de campagne les arbres des restes de la campagne précédente et à éliminer régulièrement les fruits malades sources

potentielles d'inoculum (Braudeau, 1969 ; Coulibaly *et al.*, 2017). La diminution de l'ombrage par la taille du cacaoyer est également une mesure à envisager. Car elle permet de produire une aération des parcelles et de diminuer l'hygrométrie ambiante. Le paillage peut également réduire l'effet splash (diffusion de l'inoculum) et constituer par la même occasion une barrière physique pour l'inoculum primaire présent dans le sol (Konam & Guest, 2002 ; Ndoungue *et al.*, 2012).

2-6-3- Lutte chimique

En agriculture, la lutte chimique contre les maladies et ravageurs des plantes est essentiellement basée sur l'utilisation des pesticides (herbicides, insecticides, fongicides, rottenticides et nematicides). Dans le contexte de la lutte contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer, les fongicides ont été couramment utilisés dans tous les pays producteurs de cacao (Akrofi, 2015 ; Santos *et al.*, 2018). Les principaux fongicides appliqués sont des fongicides de contact à base de cuivre et des fongicides systémiques contenant du métalaxyl (Tableau I) (Pohé *et al.*, 2013 ; Coulibaly *et al.*, 2017). Les fongicides de contact, non pénétrants adhèrent à la surface de la cabosse. En période épidémique, ils sont appliqués tous les 14 jours à raison de 8 à 12 traitements dans l'année. Les fongicides dits systémiques, pénètrent dans les premières couches du cortex, conférant une meilleure protection aux fruits. Ces traitements se font tous les 21 jours soit 4 à 6 traitements dans l'année (Opoku *et al.*, 2000, 2007b ; Sonwa *et al.*, 2008 ; Coulibaly *et al.*, 2017). L'application normale des traitements phytosanitaires est onéreuse pour les planteurs en Afrique qui dans la majorité n'ont pas de grands revenus (Pohé *et al.*, 2013). Ces produits chimiques ont aussi des conséquences néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement. Par ailleurs, le risque d'apparition de souches résistantes au métalaxyl demeure important et l'application abusive des produits chimiques est non respectueuse de l'environnement et non durable (Pohé *et al.*, 2013). Une nouvelle méthode d'injection d'acide phosphonique (phosphonate) dans les troncs de cacaoyer a été mise au point en Australie et expérimentée avec succès pour lutter contre la pourriture des cabosses et les chancre de *Phytophthora palmivora* en Papouasie-Nouvelle-Guinée et contre *Phytophthora megakarya* au Ghana (Guest *et al.*, 1994 ; Akrofi *et al.*, 2003 ; Opokou *et al.*, 2007 a). Cependant, cette méthode n'a pas pu être recommandée pour la lutte contre la pourriture brune des cabosses en Afrique de l'ouest car elle est très coûteuse et le produit peut provoquer une brûlure des tissus internes des cacaoyers injectés (Akrofi *et al.*, 2003).

Tableau I : Liste des principaux fongicides utilisés dans la lutte contre la pourriture brune en Côte d'Ivoire

N° d'ordre	Nom commercial	Matières actives et teneurs	Classe/FAO/OMS
1	ALGOMIL 72% WP	Métalaxyl-M : 12 % oxyde de cuivre : 60 %	III
2	CALLICUIVRE (2)	Oxychlorure de cuivre : 50 %	III
3	CALLOMIL PLUS 72 WP	Oxyde de cuivre : 600g/kg Métalaxyl : 120g/kg	III
4	CALLOMIL PLUS 66 WP	Métalaxyl-M : 60g/kg Oxyde de cuivre : 600g/kg	III
5	FANTIC PLUS 69 WP	Benalaxyl-M : 90g/kg Oxyde d'hydroxyde de cuivre : 600g/kg	III
6	FONGEX C77 WP	Hydroxyde de cuivre 77 %	III
7	FONGICAO 72% WP	Mancozèbe : 640g/kg Métalaxyl : 80g/kg	III
8	FONGIO PLUS 72% WP	Métalaxyl-M : 120g/kg Oxyde de cuivre : 600g/kg	III
9	FONGIS 72 WP	Métalaxyl-M : 60g/kg Oxyde de cuivre : 600g/kg	III
10	FORUM 46 WP	Diméthomorphe: 6 % Oxychlorure de cuivre 40 %	III
11	FUNGURAN OH 50 WP	Hydroxyde de cuivre 500g/kg	III
12	KOCIDE 2000 H	Hydroxyde de cuivre 500g/kg	III
13	MANCONIL 72 % WP	Mancozèbe:640g/kg Cymoxanil:80g/kg	III
14	METALM 72 WP	Métalaxyl : 120g/kg Oxyde de cuivre : 600g/kg	III
15	NORDOX 75 WG	cuivre sous forme oxyde de : 75 %	III
16	REVUS 250 SC	Mandipropamide : 250 g/l	III
17	RIDOMIL GOLD PLUS 65 WP	Mefenoxam (MétaxylM) : 5 % Hydroxyde de cuivre 60 %	III
18	RIDOMIL GOLD PLUS 66 WP	Métalaxyl-M : 6 % Oxyde de cuivre : 60 %	III
19	TROPIC 66 WP	Métalaxyl-M : 6 % Oxyde de cuivre : 60 %	III
20	ULTIMAX PLUS 72% WP	Métalaxyl :12% Oxyde de cuivre :60 %	III

III : légèrement dangereux ; Source : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, (2018).

2-6-4- Lutte génétique

La lutte génétique ou la sélection variétale est une stratégie de lutte durable. Elle est basée sur la production de variétés résistantes (Lachenaud *et al.*, 2007). De nombreuses variétés ont montré une résistance aux agents fongiques responsables de la pourriture brune (Gutiérrez-López *et al.*, 2016). Plusieurs instituts de recherche sur le cacao ont établi des programmes de multiplication en sélectionnant des variétés dans les conditions locales qui résistent aux souches locales du genre *Phytophthora*. En Afrique de l'Ouest, des clones et hybrides de la collection Pound tels que l'IMC (Iquitos Mixed Calabacillos) 47, le SNK (Sélection de Nkoemvone) 413, le SCA (Scavina) 6, le SCA (Scavina) 12 et le P (Pound) 7 et le PA (Parinari) 150 présentent une bonne résistance aux espèces *Phytophthora megakarya* et *Phytophthora palmivora* (Nayadanu *et al.*, 2012). Thevenin *et al.* (2012) ont établi que le cluster génétique guyanais est une source importante de résistance à cette espèce. Cinquante-neuf de ces clones étaient aussi plus résistants à l'espèce *Phytophthora palmivora* que SCA 6, qui a été utilisé comme témoin résistant. Une résistance à l'espèce *Phytophthora megakarya* a été également trouvée chez des cacaoyers sauvages collectés en Guyane française (Motamayor *et al.*, 2008 ; Paulin *et al.*, 2010).

Les cabosses sont les principaux organes d'importance économiques du cacaoyer. Les attaques des cabosses au champ est considérée comme le meilleur critère pour évaluer la résistance d'un clone de cacaoyer à la pourriture brune (Efombagn *et al.*, 2006 ; Efombagn *et al.*, 2013). Cependant, la longue période de développement du cacaoyer avant la production des cabosses nécessite des méthodes alternatives pour évaluer la résistance. La corrélation positive établie au champ, entre la résistance des feuilles et celle des cabosses à la pourriture brune, a été donc utilisée pour faciliter et accélérer la sélection de génotypes résistants au genre *Phytophthora* spp. (Tahi *et al.*, 2006 a; 2006 b; 2007). Les méthodes de sélection artificielle ont pris en compte l'inoculation des cabosses détachées ou non, l'inoculation des disques foliaires et l'inoculation des jeunes plantes. Toutes ces méthodes présentent des avantages et des inconvénients. Parfois, la résistance à la pourriture brune des cabosses ne correspond pas à la résistance au chancre des tiges (N'Goran & Eskes, 2006 ; Akrofi, 2015).

2-6-5- Lutte biologique

La lutte biologique a été définie comme étant une condition ou une pratique par laquelle la survie ou l'activité d'un pathogène est réduite à travers l'usage de tout autre organisme vivant autre que l'homme, avec pour résultat la réduction de l'incidence de la maladie (Mpika, 2010). Cook et Baker (1984), l'ont défini comme la réduction de la densité d'inoculum ou des activités productrices de la maladie, d'un pathogène dans son stade actif ou dormant par un ou plusieurs organismes. Elle peut être accomplie naturellement à travers la manipulation de l'environnement mais aussi par l'introduction massive d'un ou plusieurs antagonistes. Les antagonistes sont des agents de lutte biologique qui agissent en réduisant l'inoculum et/ou en interférant avec une ou plusieurs étapes du cycle infectieux du pathogène. L'antagonisme microbien désigne la somme des influences défavorables qu'un microorganisme saprophyte bien choisi exerce à l'encontre d'un pathogène. Les processus d'antagonisme se manifestent fréquemment par la compétition pour les éléments nutritifs indispensables à la croissance, par l'antibiose (phénomène d'inhibition d'un microorganisme par une substance inhibitrice ou toxique produite par un autre microorganisme), par l'induction de résistance systémique chez la plante hôte, par le parasitisme et par la diminution de l'agressivité du pathogène ou d'autres formes particulières d'interférence (Akrofi, 2015).

Plusieurs microorganismes dont des champignons et des bactéries isolés antagonistes de *P. palmivora* ont été identifiés (ten Hoopen *et al.*, 2011 ; Masanto *et al.*, 2020). Par exemple, les bactéries *Pseudomonas putida* biotype A, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas spinosa*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia* sp., *Bacillus sphaericus*, *Bacillus polymyxa* et *Serratia marcescens* ont été antagonistes de *Phytophthora palmivora* dans des expériences *in vitro* (de Souza *et al.*, 2003 ; Macagnan *et al.*, 2006 ; Tran *et al.*, 2007 ; Hanada *et al.*, 2009; Mpika *et al.*, 2009 ; Melnick *et al.*, 2011 ; Alsultan *et al.*, 2019 ; Masanto *et al.*, 2020). Des essais de lutte biologique réalisés au Cameroun, avec la souche fongique *Trichoderma asperellum*, ont donné des résultats prometteurs, mais pas aussi efficace que le contrôle chimique (Tondje *et al.*, 2007).

Cette souche a présenté des activités mycoparasitaires contre les espèces phytopathogènes *Phytophthora capsici*, *Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora palmivora*. En outre, *Trichoderma* a aussi montré *in vitro* des activités substantielles de laminarinase et de cellulase deux enzymes qui peuvent nuire aux parois cellulaires de *Phytophthora* spp. (Tondje *et al.*, 2007).

Les effets fongicides de trois espèces de champignons endophytes (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Clonostachys rosea* et *Botryosphaeria ribis*) dans la lutte contre les genres *Moniliophthora* spp., et *Phytophthora* spp, ont été évalués au Panama. Le résultat a montré une baisse significative de la pourriture des cabosses due au genre *Phytophthora* spp., suite à un traitement avec l'espèce *Colletotrichum gloeosporioides*. Par ailleurs, il a été également observé une réduction de l'incidence des lésions sporulantes induites par l'espèce *Moniliophthora roreri* après un traitement avec l'espèce *Clonostachys rosea* (Méija *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2010).

Plusieurs substances naturelles, dont des extraits de plantes et des composés bioactifs produits par des microorganismes, ont été évaluées pour le contrôle de *Phytophthora* sur le cacaoyer (Widmer & Laurent, 2006). Ainsi, des études ont montré que les extraits de feuilles de romarin (*Rosmarinus officinalis*) et de lavande (*Lavandula officinalis*) réduisaient la germination des zoospores des espèces *Phytophthora capsici*, *Phytophthora megakarya* et *Phytophthora palmivora* (Widmer & Laurent, 2006). Selon ces auteurs, ces extraits de romarin contiennent de l'acide caféique, de l'acide rosmarinique ou leurs dérivés, qui pourraient digérer ou inhiber les zoospores de *Phytophthora* spp (Widmer & Laurent, 2006).

Chapitre 3 : Généralités sur les bactéries endophytes

3-1- Diversité microbienne du sol

Le sol est une entité naturelle vivante et dynamique à la surface de la terre (Faugier, 2010). Il est le support d'une large proportion de la biodiversité terrestre. Il héberge en effet une grande diversité de macroorganismes et de microorganismes vivant en interaction continue (plantes, vers, nématodes, acariens, protozoaires, algues, champignons, bactéries, archaea, etc...) (Roger & Garcia, 2001 ; Faugier, 2010). On estime qu'il y a pour un gramme (1g) de sol, entre 10^{10} et 10^{11} bactéries regroupées entre 6000 et 50 000 espèces et jusqu'à 200 m d'hyphes fongiques (Curtis *et al.*, 2002 ; Horner-Devine *et al.*, 2003 ; Leake *et al.*, 2004). Cependant, cette forte richesse spécifique ne reflète pas exactement la richesse fonctionnelle du sol (Gamfeldt *et al.*, 2008 ; Flynn *et al.*, 2009). Des études ont montré que 80 % des cellules bactériennes du sol sont en dormance lorsque les conditions ambiantes ne leur sont pas favorables (Bever *et al.*, 2012). Les microorganismes sont fortement impliqués dans de nombreuses fonctions d'intérêts. Par exemple, les cycles du carbone et de l'azote, la biodisponibilité des éléments nutritifs, la dégradation de polluants organiques, la rétention des métaux lourds, etc... (Maron *et al.*, 2011 ; Ranjard *et al.*, 2017 ; Terrat *et al.*, 2018).

3-2- Rhizosphère

La rhizosphère est la partie du sol influencée par la présence de la racine. On distingue en général trois zones dans la rhizosphère: la rhizosphère au sens stricte, mince couche de sol qui adhère fortement à la racine. Mais qui peut en être détachée par lavage et agitation modérée dans l'eau. Le rhizoplan, dont la microflore est extraite par une agitation vigoureuse des racines déjà traitées. L'endorhizosphère représentée par les espaces intercellulaires du cortex colonisés par les microorganismes.

Dans la rhizosphère, la microflore est profondément modifiée sous l'effet des exsudats racinaires, des résidus cellulaires. Ainsi que des actions de la racine sur l'environnement (modification des conditions d'oxygénation, de concentration saline, etc...). En retour, l'activité des microorganismes est importante pour la plante à travers la mise à disposition ou compétition pour les éléments nutritifs et l'action sur la morphologie de la racine. C'est l'ensemble de ces interactions qui est appelé "effet rhizosphère". C'est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micro et macronutriments du sol. Les diverses

interactions biotiques et abiotiques qui ont lieu au sein de la rhizosphère, en font un milieu complexe et structuré (Roger & Garcia, 2001 ; Barea *et al.*, 2005 ; Gholami *et al.*, 2012).

3-3- Bactéries endophytes

Les bactéries endophytes sont des bactéries présentes dans les tissus des plantes. Elles sont connues depuis plus d'un siècle. En 1926, la croissance endophytique a été reconnue comme un stade particulier de la vie de certaines rhizobactéries. Elle a été décrite comme un stade avancé d'infection ayant une relation étroite avec la symbiose mutualiste (Sørensen & Sessitsch, 2006). Plus tard, les endophytes ont été définis comme des microorganismes qui pouvaient être isolés d'organes végétaux stérilisés en surface (Sørensen & Sessitsch, 2006). En agronomie, ce concept a été élargi pour englober toutes les bactéries qui peuvent être isolées des tissus végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, nodosités etc...) stérilisés en surface et ne nuisent pas visiblement aux plantes hôtes (Hallmann *et al.*, 1997).

Les bactéries endophytes sont divisées en deux grands groupes : les bactéries endophytes symbiotiques et les bactéries endophytes associées. Les bactéries endophytes symbiotiques vivent dans l'espace intracellulaire. Elles vivent dans ce cas dans des structures particulières appelées nodosités. C'est l'exemple de la symbiose légumineuse-*Rhizobium*. Quant aux bactéries endophytes associées, elles vivent dans l'espace intercellulaire des tissus végétaux. Celles-ci sont initialement présentes dans le rhizoplan et migrent ensuite à l'intérieur de la plante où elles nichent dans l'espace intercellulaire. Ces bactéries sont également qualifiées de fixatrices d'azote non symbiotiques (Tilak *et al.*, 2005 ; Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006).

Ces bactéries endophytes proviennent souvent du sol. Elles infectent initialement la plante hôte en colonisant par exemple, les fissures formées dans les jonctions radiculaires latérales, puis se propagent rapidement aux espaces intercellulaires de la racine (Chi *et al.*, 2005). Les fissures radiculaires sont reconnues comme les principaux "points chauds" de la colonisation bactérienne (Sørensen & Sessitsch, 2006), bien qu'il existe d'autres portails d'entrée dans la plante. Par exemple, les blessures causées par des phytopathogènes microbiens ou des nématodes, ou les stomates présents dans le tissu foliaire (McCully, 2005).

3-3-1- Bactéries endophytes symbiotiques

Les bactéries endophytes symbiotiques fixent indirectement l'azote moléculaire (N₂) et le mettent à profit des plantes hôtes comme illustrés par la célèbre symbiose légumineuse-rhizobium (Jordan,

1984). Celles-ci incluent toutes les genres de bactéries fixatrices d'azote capables d'établir une relation à bénéfice réciproque avec la plante hôte. La plante hôte offre au microorganisme une niche écologique idéale par la formation d'une structure hautement spécifique appelée nodosité. Le microorganisme en retour fournit de l'azote à la plante (Jordan, 1984). Deux groupes de bactéries fixatrices d'azote ont été étudiés de manière approfondie, à savoir *Frankia* et *Rhizobia* (Saharan & Nehra, 2011).

3-3-1-1- Genre *Frankia*

Les bactéries du genre *Frankia* sont des Actinobactéries filamenteuses, à Gram positif, fixatrices d'azote que l'on trouve dans le sol et en associations symbiotiques avec les plantes actinorhiziennes (Rehan *et al.*, 2016). Les Actinobactéries sont définies phylogénétiquement comme un taxon ayant un pourcentage élevé en bases G et C (haut G+C %) du phylum des bactéries à Gram positif : les Actinomycètes (Sen *et al.*, 2014). Ces Actinomycètes forment des nodules racinaires (actinorhizes) sur plus de 280 espèces de plantes ligneuses de 8 familles différentes (Rehan *et al.*, 2016). Ils fixent l'azote en convertissant l'azote atmosphérique en ammoniacque biologiquement utile et fournissent ainsi aux plantes hôtes une source d'azote réduite. Cette symbiose est très proche de celle établie par les rhizobia et les légumineuses en termes d'évolution, de structure et de fonction (Provorov *et al.* 2002). Mais elle reste encore moins bien comprise. Les espèces végétales des genres *Alnus* et *Casuarina* sont reconnues pour leur capacité à former une symbiose effective avec les *Frankia* (Eugenia *et al.*, 2011 ; Gtari *et al.*, 2014).

3-3-1-2- Rhizobia

D'une manière générale, les rhizobia sont des bactéries fixatrices d'azote qui forment des nodules racinaires avec les légumineuses (Mendoza-Suárez *et al.*, 2020). Ils appartiennent à la famille des Rhizobiaceae (Jordan, 1984). Des changements considérables ont affecté leur statut taxonomique durant ces dernières décennies. Sahgal & Johri (2003), ont publié le statut réarrangé de la taxonomie des Rhizobia en se basant sur l'approche polyphasique et ont identifié 36 espèces réparties en sept genres dont: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*. Aujourd'hui le groupe des Rhizobia compte plus de 120 espèces réparties en 18 genres (González *et al.*, 2019) dont 10 genres de la classe des α -protéobactéries (*Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*,

Shinella), 2 genres de la classe des β -protéobactéries (*Burkholderia*, *Cupriavidus* (*Ralstonia*)) et certaines γ -protéobactéries dont *Pseudomonas* sp (Wolde-meskel *et al.*, 2005 ; Berrada & Fikri-Benbrahim, 2014).

3-3-1-2-1- *Rhizobium* sp.

Les bactéries du genre *Rhizobium* se présentent au microscope sous la forme de bacilles à Gram négatif de longueur allant de 0,5 à 0,9 μm et de largeur variant de 1,2 à 3,0 μm . Généralement, elles sont mobiles quand elles sont jeunes grâce à quelques flagelles péritriches, polaires ou subpolaires (Belay & Assefa, 2011). Les cellules plus âgées comportent un ou plusieurs granules réfringents de poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Le genre *Rhizobium* forme des colonies incolores, blanches ou de couleur crème sur le milieu YEM (mannitol extrait de levure). Quelques souches sont roses. Le genre *Rhizobium* a un temps de génération de 2 à 4 heures, et forme des colonies de 2 à 4 mm de diamètre en 3 à 4 jours sur milieu gélosé.

3-3-1-2-2- *Bradyrhizobium* sp.

Les espèces du genre *Bradyrhizobium* sont des bacilles Gram négatif ayant un seul flagelle subpolaire ou polaire. Comme d'autres rhizobiums, ils ont la capacité de fixer et convertir l'azote atmosphérique en des formes disponibles faciles à utiliser pour les plantes. Ils se développent lentement contrairement aux espèces du genre *Rhizobium*, qui sont considérées comme des rhizobiums à croissance rapide. Dans un bouillon liquide, il faut 3 à 5 jours à *Bradyrhizobium* pour créer une turbidité modérée et 6 à 8 heures pour doubler la taille de la population. Ils tendent à se développer mieux avec des pentoses comme source de carbone (Somasegaran, 1994). Certaines études indiquent que la co-inoculation du genre *Bradyrhizobium* et de certaines rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes peut influencer positivement la fixation symbiotique de l'azote en augmentant le nombre ou la masse des nodosités, le poids sec des nodules, le rendement de la production, la disponibilité des nutriments et l'augmentation de l'activité nitrogénase (Son *et al.*, 2006).

3-3-2- Diversité des bactéries endophytes associatives

L'étude de la diversité des bactéries endophytes associatives suscite d'énormes intérêts. Elles sont désignées comme bactéries du future dans le domaine agricole (Seghers *et al.*, 2004). De nombreux travaux de recherche ont révélé qu'il y a une grande diversité de bactéries endophytes appartenant

à différentes classes à savoir les α -Protéobactéries représenté par le genre *Azospirillum* sp., les β -Protéobactéries dont les genres *Burkholderia* sp. et *Herbaspirillum* sp. (Pedrosa *et al.*, 2011), les γ -Protéobactéries principalement le genre *Pseudomonas* sp. Les firmicutes comprennent principalement les genres *Bacillus* sp. et *Clostridium* sp. et les bactérioidètes notamment le groupe des Actinomycètes avec le genre *Streptomyces* (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006).

3-3-2-1- *Azotobacter* sp.

La famille des Azotobacteriaceae comprend deux genres (Cinnadurai *et al.*, 2013) à savoir, *Azomonas* (non kystique) avec trois espèces (*A. agilis*, *A. insignis* et *A. macrocytogenes*) et *Azotobacter* (formant des kystes) avec 6 espèces (Tchan, 1984) dont *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* et *A. Paspali*. *Azotobacter* est généralement considéré comme un fixateur libre d'azote en aérobie. Des recherches prouvent que l'application d'*Azotobacter* améliore le rendement des graminées annuelles et pérennes (Gholami *et al.*, 2009). Les souches d'*Azotobacter* pourraient affecter la germination des graines et la croissance des plantules (Gholami *et al.*, 2009).

3-3-2-2- *Azospirillum* sp.

Depuis 1970, des souches du genre *Azospirillum* ont été isolées et utilisées comme biofertilisants (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000 ; Lin *et al.*, 2009). À ce jour, le genre *Azospirillum* compte 17 espèces (Young *et al.*, 2015 ; Haiyambo & Chimwamurombe, 2018) dont *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. canadense*, *A. doebereineriae*, *A. fermentarium*, *A. formosense*, *A. halopraeferens*, *A. humicireducens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. melinis*, *A. oryzae*, *A. picis*, *A. rugosum*, *A. thiophilum* et *A. zae* (Young *et al.*, 2008 ; Lavrinenko *et al.*, 2010 ; Lin *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Mehnaz, 2015). Les bactéries du genre *Azospirillum* sont de Gram négatif fixatrices d'azote (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

3-3-2-3- *Acetobacter* sp.

Le genre *Acetobacter* comprend 16 espèces divisées en deux groupes phylogénétiques. Le premier groupe comprend 11 espèces dont *A. acetii*, *A. orleanensis*, *A. estunensis*, *A. indonesiensis*, *A. tropicalis*, *A. cibinongensis*, *A. orientalis*, *A. cerevisiae*, *A. malorum*, *A. oeni* et *A. nitrogenifigens*. Le deuxième groupe comprend cinq espèces dont *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A. pomorum*, *A. lovaniensis* et *A. syzygii* (Cleenwerck *et al.*, 2009 ; Lisdiyanti *et al.* 2002 ; Yamada & Yukphan, 2008). Les bactéries du genre *Acetobacter* peuvent fixer l'azote moléculaire et le rendre utilisable

pour la plante. Elles sont largement utilisées pour la biofertilisation de la canne à sucre en Inde (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Elles sont aussi utilisées dans la production industrielle du vinaigre en raison de leur grande capacité à oxyder l'éthanol en acide acétique et leur haute résistance à l'acide acétique libéré dans le milieu fermentaire (Andrés-Barrao *et al.*, 2013 ; Gomes *et al.*, 2018).

3-3-2-4- *Azoarcus* sp.

Le genre *Azoarcus*, abrite principalement des β -protéobactéries fixatrices d'azote (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006 ; Krause *et al.*, 2017). Ce genre comprend huit espèces reconnues, à savoir *A. indigenus*, *A. communis*, *A. tolulyticus*, *A. evansii*, *A. anaerobius*, *A. toluclasticus*, *A. toluvorans* et *A. buckelii* (Chen *et al.*, 2013). Ces espèces ont été isolées des tiges, des racines, des sédiments aquifères, des sols contaminés par le pétrole, et des boues d'épuration. Ce qui indique que les membres de ce genre sont largement répartis dans divers environnements. Ce sont des bactéries à Gram négatif (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006).

3-3-2-5- *Bacillus* sp.

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des Bacillaceae. Il se distingue des autres représentants de la famille par de nombreux caractères. Ce sont des bacilles à Gram positif à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (0,5 à 1,2 μm de diamètre et une longueur de 2,5 à 10 μm), capables de produire des endospores (forme de résistance et critère important sur le plan taxonomique du genre *Bacillus*). Ces bactéries sont parfois aéroanaérobies ou aérobies strictes et mobiles grâce à une ciliature péritriche sauf chez *Bacillus anthracis*. Elles possèdent une catalase très active et se cultivent facilement sur milieu ordinaire (Garrity *et al.*, 2005). Généralement résistantes à de fortes températures (Melnick *et al.*, 2011), les bactéries du genre *Bacillus* sp. sont capables de produire divers antibiotiques. A cet effet, ces bactéries sont sollicitées dans le biocontrôle des maladies de nombreuses plantes (Khan *et al.*, 2018). Le genre *Bacillus* sp. est capable de fixer l'azote atmosphérique, produire des phytohormones, solubiliser le phosphate et décontaminer les sols pollués par les métaux lourds et toxiques (Khan *et al.*, 2012).

3-3-2-6- *Pseudomonas* sp.

Ce sont des bactéries à Gram négatif, non-sporulées, aérobies strictes et susceptibles de fixer l'azote à l'état libre ou en association avec les plantes (Beell-Perkins & Lynch, 2002). Les espèces de *Pseudomonas* fluorescentes ont un grand pouvoir de chélation du fer et peuvent rendre l'ion

ferrique inaccessible aux autres microorganismes. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser les sidérophores qu'elles produisent (Mercado-Blanco & Bakker, 2007). *Pseudomonas* sp. produit des molécules d'antibiotiques (Heydari *et al.*, 2008) et des phytohormones (Sandhya *et al.*, 2009). Ces bactéries sont capables de déclencher la tolérance systémique induite (TSI) chez la plante vis-à-vis de facteurs abiotiques tels que la sécheresse, la salinité et les métaux lourds (Yang *et al.*, 2009). Le genre *Pseudomonas* sp. est aussi très sollicité en biostimulation, en biocontrôle et en biorémédiation (William & Daniel., 2009).

3-3-2-7- Actinomycètes

Les Actinomycètes sont en fait des bactéries à Gram positif à structure végétative de type mycélien. Ils présentent des similitudes avec les Eubactéries et les champignons. Les Actinomycètes se rapprochent morphologiquement des champignons par la formation de mycélium, souvent aérien et de conidies. Ils sont aussi caractérisés par l'absence en culture de la turbidité caractéristique des bactéries et la formation d'amas de cellules. Ils ont un taux de croissance généralement cubique et non exponentiel comme chez les Bactéries. Toutefois, les analogies entre les champignons et les Actinomycètes sont en fait une convergence de forme plutôt que d'une parenté génétique en raison de la structure procaryote des Actinomycètes alors que les Champignons ont une structure eucaryote (Roger & Garcia, 2001). Ces bactéries ont la capacité de produire divers antibiotiques. D'où leurs importances en industrie pharmaceutique et en agriculture (Kumar *et al.*, 2010). Beaucoup d'antibiotiques couramment utilisés comme l'érythromycine, la streptomycine, la rifamycine et la gentamycine sont tous des molécules biologiques ou produits naturels isolés des bactéries Actinomycètes (Jeffrey, 2008). Les genres *Streptomyces* et *Micromonospora* sont les deux grands groupes majeurs des Actinomycètes isolés du sol. Le genre *Streptomyces* produits 80 % des antibiotiques (Ariffuzzaman *et al.*, 2010).

3-3-2-8- *Clostridium* sp.

Ce sont des bactéries à Gram positif, anaérobies strictes non sporulées ayant la capacité de fixer l'azote atmosphérique au profit de la plante hôte (Tilak *et al.*, 2005). Bien que certaines espèces comme *Clostridium difficile* soient très pathogènes pour l'homme, d'autres espèces par contre comme *Clostridium thermoaceticum* sont bénéfiques en agriculture, car elles peuvent réduire le nitrate par le phénomène de la respiration (Alexander *et al.*, 1999). *Clostridium pasteurianum* est

utilisé pour réduire le sélénite ou le sélérate, tous présents dans la nappe phréatique et toxiques pour les organismes vivants, en élément solide sélénium (Yanke *et al.*, 1995). Les *Clostridium* sp. sont largement exploitées dans le domaine agricole et environnemental comme agents de biocontrôle et de biorémédiation.

3-3-2-9- Rhizobiaceae

Certaines bactéries endophytes symbiotiques peuvent se comporter autrement, en migrant dans les espaces intercellulaires et y demeurer comme des bactéries endophytes associatives chez des plantes non-légumineuses. C'est le cas des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (Chantreuil *et al.*, 2000), *Azorhizobium* (Engelhard *et al.*, 2000), *Methylobacterium* (Aaraújo *et al.*, 2002) et *Sinorhizobium* (Reiter *et al.*, 2003).

3-3-3- Effets bénéfiques des endophytes sur la plante

Les bactéries endophytes exercent des effets bénéfiques sur la croissance végétale par des mécanismes d'actions directs ou indirects. Les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement son métabolisme. Ces mécanismes pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes sont : la biofertilisation par la solubilisation des phosphates, fixation de l'azote et des minéraux nutritifs, la production de phytohormones telles que l'acide d'indole-3-acétique. L'autre mécanisme bénéfique des endophytes est le biocontrôle des agents pathogènes ou la répression des microorganismes pathogènes du sol. Ce mécanisme se fait par la production du cyanure d'hydrogène, des sidérophores, des enzymes hydrolytiques glucanase ou chitinase et d'antibiotiques. Par ailleurs, le biocontrôle peut se faire aussi à travers la concurrence pour les nutriments (Gupta *et al.*, 2000).

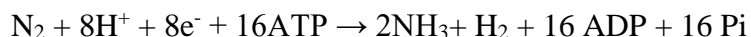
De plus, les bactéries endophytes peuvent améliorer la résistance des plantes aux stress abiotiques telles que la salinité, la sécheresse et la toxicité des métaux lourds. Un autre effet bénéfique des endophytes est la biorémédiation des sols contaminés à travers la dégradation des métaux lourds et des pesticides.

Sur la base de leurs activités, Somers *et al.* (2004) ont classé les bactéries endophytes comme des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Comme des bioremédiateurs capables de dégrader les polluants organiques et enfin comme des biopesticides ou agents de biocontrôle des maladies des plantes (Jha *et al.*, 2013).

3-3-3-1- Biofertilisation

3-3-3-1-1- Fixation de l'azote

La fixation biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne. L'azote est un nutriment essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes. L'utilisation d'engrais bio tels que les bactéries fixatrices d'azote peut accroître la productivité. Elle constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production agricole. Ces microorganismes jouent un rôle important dans l'agriculture en favorisant la circulation des éléments nutritifs (Figueiredo *et al.*, 2007). On désigne par fixation biologique de l'azote moléculaire (N₂) sa réduction par un complexe enzymatique : la nitrogénase ou complexe nitrogénasique. Ce complexe métallo-enzymatique qui n'existe que chez les procaryotes est capable de catalyser l'hydrolyse de la triple liaison N≡N et de réduire l'azote moléculaire N₂ en ammoniac NH₃ selon la réaction ci-dessous.



Diverses bactéries fixatrices d'azote comme *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, et *Serratia* ont été isolées de la rhizosphère de diverses cultures (Jha *et al.*, 2013).

3-3-3-1-2- Solubilisation des phosphates

Le phosphore est un des principaux macronutriments essentiels à la croissance et au développement des plantes. C'est un élément nutritif indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes (Rfaki *et al.*, 2014). En effet, il joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des plantes. Il intervient dans pratiquement tous les processus métaboliques majeurs de la plante dont la photosynthèse, le transfert d'énergie, la biosynthèse des macromolécules, la respiration (Khan *et al.*, 2010) et la fixation de l'azote chez les légumineuses (Saber *et al.*, 2005).

Les bactéries solubilisant le phosphate colonisent la rhizosphère des plantes et leur nombre varie en fonction du type de sol (Mohammadi, 2012). Ces bactéries peuvent solubiliser le phosphore des sources organiques et inorganiques par l'action d'acides organiques et d'enzymes extracellulaires

qui sont sécrétés dans le sol (Park *et al.*, 2011 ; Baliah *et al.*, 2016 ; Gurikar *et al.*, 2016). Les acides organiques solubilisent les phosphates minéraux et réduisent le pH du sol (Gomes *et al.*, 2014). Diverses acides ont été cités dans la littérature à savoir l'acide gluconique (Fankem *et al.*, 2006), l'acide oxalique, l'acide citrique (Reyes *et al.*, 2001), l'acide lactique (Vyas & Gulati 2009), l'acide tartrique, l'acide aspartique et les acides propionique, isovalérique, heptonique, caproïque, isocaproïque, formique, valérique, succinique, oxalique, oxaloacétique, Malonique (Lopez *et al.*, 2011).

La solubilisation du phosphate organique est aussi réalisée grâce à l'action de différents enzymes qui sont :

(i) des phosphatases acides non spécifiques, déphosphorylant les liaisons phospho-ester ou phosphoanhydride de la matière organique (Renella *et al.*, 2006 ; Jorquera *et al.*, 2008 ; Nannipieri *et al.*, 2011) ;

(ii) les phytases, qui causent spécifiquement la libération de phosphore (P) lors de la dégradation des phytates. Dans sa forme basique, le phytate est la principale source d'inositol et la principale forme stockée de P dans les graines des plantes et le pollen, il constitue une composante majeure du phosphore organique dans le sol ;

(iii) les phosphatases et les lyases C-P qui coupent les liaisons carbone-phosphate des organophosphonates (Rodriguez *et al.*, 2006). En plus des bactéries, des champignons et des Actinomycètes, des algues telles que les cyanobactéries et les mycorhizes ont également été signalées pour montrer une activité de solubilisation du phosphore (Sharma *et al.*, 2013).

Les bactéries solubilisant le phosphate ont été largement testées comme inoculum biofertilisant pour améliorer le rendement des cultures (Karpagam & Nagalakshmi, 2014). Actuellement, différentes espèces bactériennes comme *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Arthrobacter ilicis*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Microbacterium laevaniformans* et *Micrococcus luteus* ont été identifiées comme engrais phosphatés (Kumar *et al.*, 2014).

Les bactéries endophytes solubilisant le phosphate sont plus compétitives que les microorganismes non endophytes ou facultatifs à l'intérieur de la plante hôte puisque l'interaction endophyte-plante est le résultat d'un processus évolutif qui est contrôlé par des gènes des deux organismes (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Cependant, la capacité des bactéries endophytes à

solubiliser les phosphates dans les sols tropicaux et sous-tropicaux n'est pas bien étudiée (de Abreu *et al.*, 2017).

3-3-3-1-3- Solubilisation du potassium

Le potassium fait partie des trois nutriments essentiels pour la croissance et le développement de la plante. Il est impliqué dans de nombreux processus biochimiques et physiologiques chez les plantes telle que la régulation stomatique (ouverture et fermeture des stomates). Le bon fonctionnement des stomates est essentiel pour la photosynthèse. L'activation des enzymes par le potassium et son implication dans la production d'adénosine triphosphate (ATP) est importante dans la régulation du taux de photosynthèse. Les sucres produits dans la photosynthèse doivent être transportés par le phloème vers d'autres parties de la plante en vue de leur utilisation ou stockage. Le système de transport des plantes utilise de l'énergie sous forme d'ATP. Si le potassium est insuffisant, moins d'ATP est disponible, et le système de transport tombe en panne. Le potassium joue également un rôle majeur dans le transport de l'eau et des nutriments dans la plante par le xylème. L'enzyme responsable de la synthèse de l'amidon (l'amidon synthétase) est activée par le potassium (Pettigrew, 2008). Les carences en potassium peuvent entraîner une perte sévère en termes de rendement et de qualité de la production agricole. Il est aussi impliqué dans la conservation durable des cultures, dans la résistance des plantes aux maladies et aux parasites (Khawilkar & Ramteke, 1993 ; Meena *et al.*, 2015).

La plupart des sols agricoles contiennent de grandes réserves de potassium, dont une partie considérable a été accumulée à la suite d'applications régulières des engrais potassiques. La concentration de potassium dissous dans le sol varie autour de 1 à 2 % et plus de 90 % du potassium est sous forme de roches insolubles et de minéraux de silicate (mica, muscovite, feldspath, microcline, orthoclase), indisponibles pour l'absorption des plantes (Parmar & Sindhu, 2013 ; Parmar *et al.*, 2016). Ainsi, la libération de formes insolubles et fixées de potassium est un aspect important de l'augmentation et de la disponibilité du potassium des sols. Les microorganismes solubilisant le potassium peuvent solubiliser les roches potassiques, comme les micas, les illites en potassium soluble, par la production et l'excrétion d'acides organiques. Le mécanisme de solubilisation du potassium utilisé par les microorganismes se fait principalement par la production des acides organiques comme l'acide citrique, l'acide formique, l'acide malique, l'acide oxalique

(Sheng, 2005). La solubilisation du potassium se produit par la formation de complexes entre les acides organiques et les ions métalliques tels que Fe^{2+} , Al^{3+} et Ca^{2+} (Štyriaková *et al.*, 2003).

Leur utilisation en tant que biofertilisants en agriculture et protection de l'environnement ont fait l'objet de recherches récentes (Prajapati & Modi, 2012). L'usage excessive d'engrais inorganiques peut entraîner une diminution de la qualité du sol et de la pollution environnementale (Lynn *et al.*, 2013). L'utilisation de bactéries solubilisant le potassium, comme engrais biologique a été suggérée comme une solution pour améliorer la nutrition des plantes. Certaines bactéries comme *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *B. mucilaginosus* et *B. edaphicus* ont été capables de dissoudre ce potassium dans le sol (Prajapati & Modi, 2012 ; Archana, 2013). Ces microorganismes du sol jouent donc un rôle essentiel dans le cycle du potassium (Murali *et al.*, 2005 ; Angraini *et al.*, 2016).

3-3-3-1-4- Production des phytohormones

Les phytohormones participent à plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaires, la différenciation tissulaire et la dominance apicale sont régulées par des hormones. De nombreuses phytohormones sont produites par les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Le rôle de la biosynthèse de ces phytohormones par ces microorganismes ne soit pas entièrement compris. Cependant, il est à noter que les mécanismes directs des rhizobactéries promotrices sur la croissance des plantes sont liés à la production des hormones de croissance. Ces hormones sont principalement les auxines, les cytokinines, les acides gibbérélliques. Ces bactérient entraînent aussi l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Lucy *et al.*, 2004 ; Tiwari *et al.*, 2017).

3-3-3-2- Mécanismes de biocontrôle

Le biocontrôle est l'ensemble des méthodes de protection des cultures basées sur l'utilisation des substances naturelles ou d'organismes vivants : champignons, bactéries ou virus, plantes et macroorganismes (Cathelin, 2016). De nombreuses recherches ont été faites sur les bactéries des genres (*Bacillus* et *Pseudomonas* et *Agrobacterium*) communément présentes dans la rhizosphère ou chez les plantes en tant qu'endophytes et possédant une grande importance dans le contrôle biologique des maladies liées au sol. Ces rhizobactéries ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques (Raaijmakers *et al.*, 2002). Ces bactéries sont largement exploitées en biocontrôle comme biopesticides (Haas & Defago, 2005). Les modes d'action des agents microbiens dans le biocontrôle ne sont pas toujours bien connus et peuvent varier pour un microorganisme donné à un

autre en fonction du pathosystème sur lequel ils sont appliqués. Mais de nombreux exemples décrivant un ou plusieurs mécanismes responsables de la réduction de la maladie sont disponibles.

3-3-3-2-1- Compétition pour l'espace et les nutriments

Les deux principales ressources nécessaires à la survie microbienne sont les nutriments et l'espace (Ghoul & Mitri, 2016). Les nutriments essentiels à la croissance microbienne et aux fonctions métaboliques comprennent: le carbone, l'azote, le phosphore, le soufre, l'hydrogène, le calcium, le fer et d'autres métaux (Kehl-Fie & Skaar, 2010). Les concentrations de ressources varieront selon l'environnement, de sorte que les microorganismes seront en compétition pour les composants limités. À mesure qu'ils se développent et produisent plus de biomasse, les groupes microbiens colonisent l'espace et rivalisent avec d'autres pour les nutriments (Ghoul & Mitri, 2016). Les microorganismes peuvent rivaliser pour les ressources énumérées ci-dessus de deux manières: (i) indirectement par le biais de la concurrence d'exploitation, qui se produit par la consommation de ressources (concurrence passive) et (ii) directement par biocontrôles, où les cellules individuelles s'endommagent mutuellement par la production de substances chimiques (Ghoul & Mitri, 2016). Ces substances chimiques peuvent être des enzymes digestives, des sidérophores ou des antibiotiques (MacLean & Gudelj, 2006 ; MacLean, 2007).

Un autre aspect important de la compétitivité d'une bactérie antagoniste est sa capacité à persister et à proliférer. Cependant, il est souvent difficile de prédire le comportement d'une bactérie dans l'environnement. La persistance d'une bactérie dans le sol peut être influencée par un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques, notamment la composition du sol, la température et la présence de prédateurs (Bashan *et al.*, 1995).

3-3-3-2-2- Antibiose et parasitisme

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les rhizobactéries bénéfiques et les bactéries endophytes pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte (Ghoul & Mitri, 2016). Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène *via* la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Certaines bactéries agents de lutte biologique peuvent produire des enzymes digestives telles que les chitinases, les glucanases, les protéases et les lipases pouvant lyser les cellules fongiques (Diggle *et al.*, 2007 ; Rendueles & Ghigo, 2012). Les souches de *B. subtilis* produisent plusieurs métabolites antifongiques tels que: la zwittermycine-A, la kanosamine, des

lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine (Rehman *et al.*, 2005) et des enzymes hydrolytiques (β -1,3-glucanase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (Leelasuphakul *et al.*, 2006).

Le parasitisme est une symbiose antagoniste entre des organismes taxonomiquement différents. Il implique une union physique permanente ou temporaire entre ceux-ci (Elad, 1995). Chez les champignons, le parasitisme est généralement appelé mycoparasitisme et est commun à tous les groupes de champignons, depuis les simples chytrides jusqu'aux basidiomycètes supérieurs (Baker, 1987). Le phénomène de mycoparasitisme a été signalé pour la première fois par Weinling, qui a observé la nature parasitaire de *Trichoderma lignorum* sur plusieurs agents pathogènes des plantes, notamment *Rhizoctania solani*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium* spp. et *Sclerotium ralfsii* (Baker, 1987).

3-3-3-2-3- Production des composés volatiles

Certaines rhizobactéries produisent des substances volatiles inhibitrices des agents pathogènes. Les substances les plus connues sont l'ammoniaque et l'acide cyanhydrique. L'inhibition *in vitro* de *Pythium* par *Enterobacter cloacae* est due à la production de l'ammoniaque. Il est produit comme un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par la bactérie (Heydari *et al.*, 2008). Le cyanure en général est synthétisé par les bactéries par la voie de décarboxylation oxydative en utilisant la glycine, le glutamate ou la méthionine comme précurseurs. Son rôle est d'éviter la prédation ou la compétition. Le cyanure joue un rôle dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes (Heydari *et al.*, 2008). La production de cyanure est fréquente chez les bactéries du genre *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphérique (Heydari *et al.*, 2008). D'autres composés volatiles comme le 2,3-butanediol et l'acétone libérés par des rhizobactéries bénéfiques entraînent une amélioration appréciable de la croissance de la plante en induisant sa résistance aux maladies (Ryu *et al.*, 2003).

3-3-3-2-4- Résistance Systémique Induite (RSI)

La résistance systémique induite (RSI) se met en place après interaction avec des microorganismes non pathogènes voire bénéfiques comme certains mycorhizes ou des rhizobactéries (Soler *et al.*, 2012). Ces microorganismes endophytes (qui s'établissent dans le système racinaire de la plante) l'aident non seulement à se protéger contre des pathogènes potentiels mais stimulent souvent la croissance de la plante (Lugtenberg & Kamilova, 2009). La RSI se caractérise par une voie de

signalisation dépendant de l'acide jasmonique, dont le dérivé actif principal est le méthyl-jasmonate (composant principal de l'arôme du Jasmin). Diverses autres molécules jouent également ce rôle de signal chez la plante comme le peroxyde d'hydrogène qui a aussi un rôle direct de défense en raison de sa toxicité pour les bioagresseurs. En milieu naturel, un ajustement fin entre les diverses voies de signalisation s'établit en permanence en fonction des variations du milieu et des contraintes subies par les plantes. Différents auteurs ont démontré l'induction de RSI en laboratoire soit par application directe de méthyl-jasmonate soit après mycorhization des plants pour la banane ou la tomate (Elsen *et al.*, 2008 ; Vos *et al.*, 2011). Ces défenses naturelles non spécifiques pourraient donc bien contribuer à une gestion alternative des bioagresseurs dans des systèmes de production plus écologiques (Pozo & Azcon-Aguilar, 2007).

3-3-3-2-5- Production d'enzymes digestives des parois fongiques

La production d'enzymes digestives qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliquée dans les attaques des champignons phytopathogènes (Ghoul & Mitri, 2016). La lyse des parois cellulaires, par les enzymes digestives excrétées par les bactéries endophytes ou les rhizobactéries est une fonction bien connue du mycoparasitisme. La chitinase, la β -1,3 glucanase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement connues dans le contrôle fongique, pour leurs propriétés dégradantes des parois cellulaires contenant la chitine, le β -1-6 glucane et les ponts glucosidiques. Les microorganismes qui produisent la chitinase ont été rapportés comme des agents efficaces de biocontrôle (Ghoul & Mitri, 2016).

3-3-3-3- Bioremédiation des sols par les bactéries endophytes

La bioremédiation est l'utilisation naturelle des organismes ou de microorganismes vivant pour neutraliser des polluants sur des sites contaminés par des substances toxiques (Govarathanan *et al.* 2015). Certains microorganismes ont la capacité de destruction ou de séquestration des polluants. Ils offrent l'avantage de préserver les propriétés biologiques et fonctionnelles des sols (Técher, 2011). Les métaux lourds sont un risque majeur de santé humaine dû à leur cytotoxicité, leur mutagénicité et leur cancérogénicité (Lim & Schoenung, 2010). Les sols pollués peuvent être aussi restaurés par l'usage des plantes, cela est appelé la phytoremédiation. La phytoremédiation est une technique éco-favorable rentable qui retient actuellement une attention considérable (Glick, 2010). L'usage synergétique des plantes et des bactéries a été avantageux pour la décontamination des sols métallifères (Singh *et al.*, 2009). La libération de l'acide 5-cetogluconique par la bactérie diazo-

trophe endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* dissout plusieurs sources de zinc (oxydes de zinc, carbonate de zinc et phosphate de zinc) et le rend disponible pour la plante (Saravanan *et al.*, 2007). Madhaiyan *et al.* (2007) ont rapporté que l'inoculation des plantes de tomates avec les bactéries endophytes, *Magnaporthe oryzae* et *Burkholderia* sp. a amélioré non seulement leur croissance mais a réduit aussi l'accumulation du cadmium et du nickel dans les organes (racines et les tiges) et aussi leur disponibilité dans le sol. Les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont par exemple connus pour leurs capacités à métaboliser une grande variété d'hydrocarbures aromatiques (le toluène, le m-xylène, le naphthalène et le phénanthrène) avec un nombre restreint d'enzymes, sans exposition préalable aux polluants (Rochelle *et al.*, 2005 ; Rojo, 2010). Les *Sphingomonas* sont également étudiés pour le catabolisme de molécules cycliques de type diphényle (substitué ou non), organochlorés, dioxines, œstradiol, ainsi que différents pesticides (Basta *et al.*, 2005). Les bactéries endophytes ont la capacité d'améliorer la croissance des plantes en produisant non seulement des substances favorisant leur croissance, mais aussi en permettant la biorestauration des sols contaminés par les métaux lourds (Zhang *et al.* 2011 b; Govarthanam *et al.*, 2016).

3-3-4- Biopesticides

3-3-4-1- Définition

Les biopesticides ou agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ce sont des organismes vivants ou des produits issus de ces organismes ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures (Deravel *et al.*, 2014 ; Senthil-Nathan, 2015). De nos jours, ils sont classés en trois grandes catégories selon leur origine (microbienne, végétale ou animale) et présentent de nombreux avantages.

Certains biopesticides microbiens peuvent être constitués de bactéries, de champignons, de virus et de protozoaires (Deravel *et al.*, 2014). Diverses espèces bactériennes, en particulier *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc., ont été utilisées comme biopesticides et sont principalement utilisées pour lutter contre les maladies et les insectes ravageurs des plantes (Senthil-Nathan, 2015). L'efficacité d'un nombre important de biopesticides repose sur des substances actives dérivées des microorganismes. Ce sont, en principe, ces substances actives qui agissent contre le bio-agresseur plutôt que le microorganisme lui-même (Thakore, 2006 ; Deravel *et al.*, 2014).

3-3-4-2- Avantages des biopesticides

Les biopesticides offrent de nombreux avantages car leur nature permet leur utilisation aussi bien en agriculture biologique qu'en agriculture conventionnelle (Deravel *et al.*, 2014). Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue *vis-à-vis* des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes (Deravel *et al.*, 2014 ; Tijjani *et al.*, 2016). Certains biopesticides microbiens présentent des bénéfices supplémentaires à leur rôle de protection. Les champignons du genre *Trichoderma* ont la particularité de faciliter l'absorption d'éléments nutritifs du sol par les plantes (Harman, 2011).

De même, il a été récemment mis en évidence que certains microorganismes endophytes et/ou certaines rhizobactéries bénéfiques favorisant la croissance des plantes peuvent conférer à certaines cultures une tolérance aux stress abiotiques comme la sécheresse (Compant *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012). Ces bactéries sont connues pour leur capacité à favoriser la croissance des plantes. Les molécules bioactives ont plusieurs modes d'action, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour limiter l'apparition de bio-agresseurs résistants. Ainsi, les lipopeptides cycliques produits par les bactéries du genre *Bacillus* peuvent, à la fois, faciliter la colonisation de l'environnement par le microorganisme producteur, avoir une activité antifongique directe sur les pathogènes fongiques du sol et induire des mécanismes de défense chez la plante hôte (Ongena *et al.*, 2008).

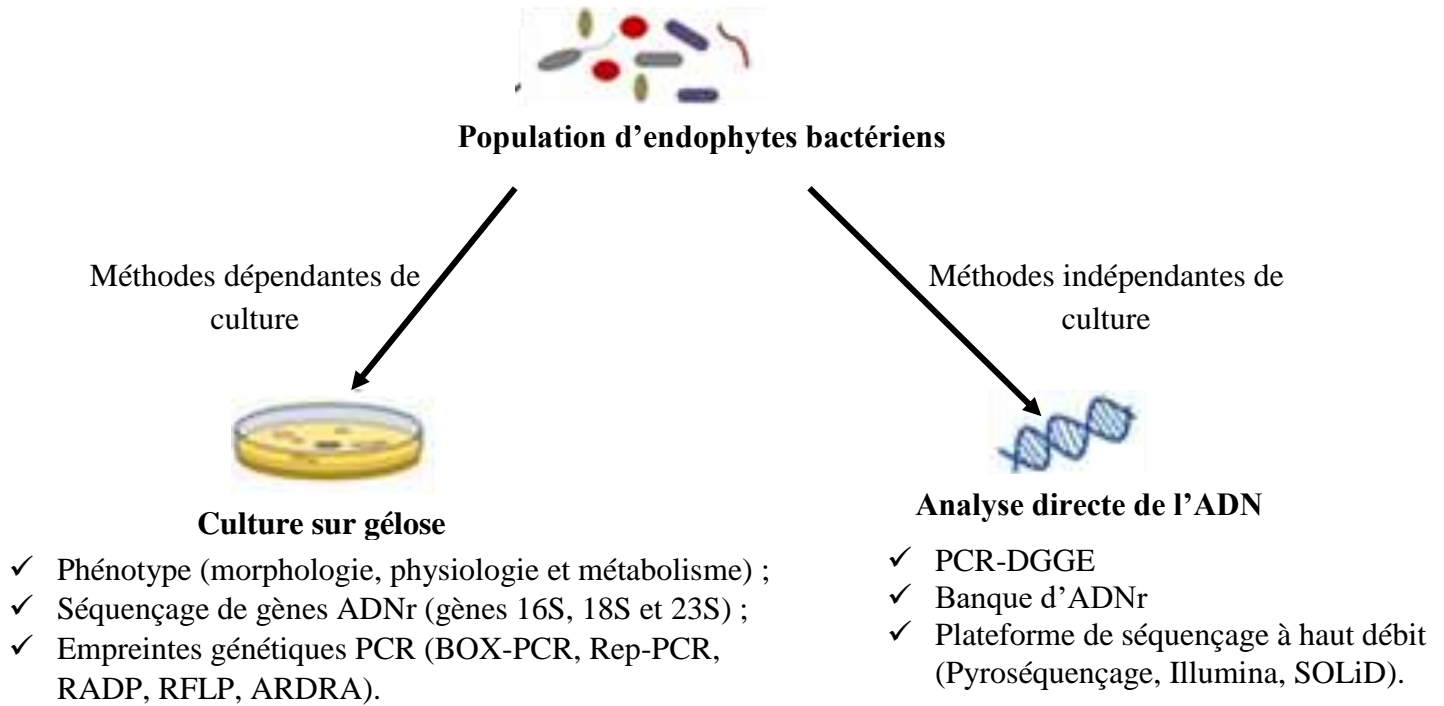
3-3-4-3- Limites des biopesticides

Malgré les nombreux avantages associés à l'utilisation des biopesticides, leur commercialisation reste toujours limitée en raison d'un certain nombre de contraintes. Les biopesticides ont un effet protecteur parfois insuffisant ou constant par rapport aux produits chimiques. En effet, leur action ou activité est conditionnée par divers facteurs abiotiques tels que la température, le type de sol, l'humidité, le pH, et autres (Shishkoff & McGrath, 2002 ; Mendoza *et al.*, 2003). La plupart des agents de biocontrôle ont leur coût de production et le délai d'enregistrement élevés (Fravel *et al.*, 1999). De même, le conditionnement et la formulation sont très difficiles pour des espèces non sporulantes et même parfois pour les espèces sporulantes (Hjeljord *et al.*, 2000; Collins & Jacobsen, 2003).

Par ailleurs, les pesticides chimiques peuvent offrir rapidement une activité beaucoup plus efficace, tandis que les biopesticides peuvent avoir besoin de plus de temps après leur application pour commencer à agir. La plupart des biopesticides étant composés d'organismes vivants, ils ont un spectre relativement restreint de ravageurs cibles et leur action se fait sur une longue période (Popp *et al.*, 2013).

3-3-5- Techniques d'étude des bactéries endophytes

L'étude des microorganismes associés aux plantes est importante, non seulement pour comprendre leur rôle écologique et leur interaction avec les plantes, mais aussi pour permettre l'application biotechnologique de ces isolats à la gestion des plantes (Idris *et al.*, 2004). Les connaissances actuelles sur les structures des communautés microbiennes chez différentes espèces végétales reposent principalement sur deux approches différentes (Figure 11). Une approche dépendante de l'isolement par culture. Dans ce cas les microorganismes, isolés du matériel végétal, sont cultivés et identifiés par une combinaison de caractères phénotypiques et de moléculaires. L'autre approche est indépendante de la culture. Dans ce cas les microorganismes sont détectés sans culture. Cette méthode est basée sur l'extraction et les analyses d'ADN (de Melo Pereira *et al.*, 2012). Le cas idéal combine plusieurs approches pour une connaissance approfondie de l'environnement microbiologique étudié (Vandenberghe *et al.*, 2017).



(Vandenberghe *et al.*, 2017)

Figure 11 : Schématisation des méthodes d'études des bactéries endophytes des plantes

3-3-5-1- Méthodes classiques basées sur l'isolement

Les méthodes classiques basées sur la culture ont été utilisées depuis longtemps pour déterminer la diversité des microorganismes associés à divers végétaux, tels que le bananier, le riz, la pomme de terre, le maïs, l'eucalyptus, le sorgho, le soja et le blé, le caroubier, le cacaoyer (Zinniel *et al.*, 2002 ; Xia *et al.*, 2011 ; de Melo Pereira *et al.*, 2012 ; Babu & Kim, 2013 ; Konaté *et al.*, 2014 a ; Konaté *et al.*, 2015 b). Ces méthodes reposent sur la croissance des microorganismes sur des milieux gélosés sélectifs, puis sur leur caractérisation et leur identification. La caractérisation phénotypique d'identification a été couramment utilisée. Celle-ci regroupe les caractères morphologiques, physiologiques et métaboliques. Comme ces propriétés peuvent varier à la fois en fonction des changements des conditions du milieu de culture et des mutations naturelles, de telles procédures ont été jugées insuffisantes pour une identification correcte et fiable des microorganismes. En plus ces méthodes classiques ont été généralement longues et laborieuses. L'application de méthodes moléculaires récemment développées à des études d'écologie microbienne surmonte bon nombre de ces limites et a conduit à des avancées majeures dans la compréhension de la diversité des microorganismes liés aux végétaux (Ikeda *et al.*, 2013).

Le séquençage des régions conservées de l'ADN microbien a été largement utilisé pour caractériser les microorganismes favorisant la croissance des plantes (Marques *et al.*, 2008 ; Verma *et al.*, 2009).

Le gène de l'ARNr ribosomique 16S des bactéries est en générale ciblé pour l'amplification par PCR, tandis que les gènes de l'ARNr 18S et 26S sont généralement ciblés dans les investigations des communautés eucaryotes (fongiques). Verma *et al.* (2009) ont appliqué une approche polyphasique pour identifier 217 bactéries endophytes isolées du maïs. La combinaison de tests métaboliques et l'identification génétique par PCR et le séquençage de l'ARNr 16S a révélé la présence de bactéries endophytes appartenant aux genres *Pantoea*, *Bacillus*, *Burkholderia* et *Klebsiella* (Ikeda *et al.*, 2013).

Différentes méthodes d'empreintes génétiques basées sur la PCR, ont été utilisées pour regrouper et différencier les espèces microbiennes isolées des végétaux. Ce sont la BOX-PCR, la Rep-PCR, la RAPD, la RFLP, l'AFLP et l'ARDRA (Ikeda *et al.*, 2013). Toutes ces méthodes supposent que les variations d'ADN chez une souche microbienne peuvent être utilisées pour la classification. En raison de la disponibilité de nombreuses méthodes dans la littérature, il est parfois difficile de choisir une méthode appropriée pour une analyse particulière pour deux raisons principales: il est

difficile de regrouper des cultures microbiennes avant le séquençage; et de faire une caractérisation des souches microbiennes au sein d'une espèce (Ikeda *et al.*, 2013).

La technique Rep-PCR est fiable dans l'étude des bactériens endophytes des plantes. D'autres méthodes ont également été utilisées avec succès pour regrouper les bactéries endophytes de différentes plantes. Ces techniques ont été l'ARDRA-PCR dans le cas des endophytes bactériens isolés des racines de riz (Menna *et al.*, 2009), la BOX-PCR dans le cas des endophytes bactériens isolés des racines du maïs (Xia *et al.*, 2011) et l'AFLP dans le cas des endophytes bactériens isolés des racines de bananier (Zhang *et al.*, 2013).

3-3-5-2- Méthodes d'empreintes moléculaires d'études des communautés endophytes

Les méthodes d'empreintes moléculaires ont été couramment adoptées dans l'étude des communautés endophytes. Ces techniques utilisent fréquemment les gènes de l'ARNr 16S (ADNr) chez les bactéries ou de l'ARNr 18S chez les champignons. Ces gènes sont des marqueurs phylogénétiques stables permettant de décrire la diversité microbienne dans les environnements naturels sans avoir besoin de cultures (Anderson & Cairney, 2004). Les méthodes d'empreintes génétiques qui reposent sur l'analyse des gènes de l'ARNr 16S sont : l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) ou à gradient de température (TGGE), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP), le polymorphisme de conformation simple-brin (SSCP) et le clonage de l'ADNr 16S. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients comme l'indique le Tableau II (Martins, 2012).

Tableau II : Avantages et inconvénients des techniques moléculaires d'empreintes génétiques

Techniques	Principe de séparation des fragments	Avantages	Inconvénients
DGGE/TGGE	Polymorphisme de séquences de fragments	Très sensibles, permet de distinguer deux fragments divergents d'une seule paire de bases ; Possibilité d'exciser des bandes d'intérêt et de les séquencer	Longue et laborieuse à mettre en œuvre, admet seulement des fragments de faible taille, limitant l'étude phylogénique par la suite; Ne permet pas de résoudre ni des séquences très riches en GC ni des écosystèmes complexes.
SSCP	Polymorphisme de séquences de fragments	Automatisable (CE-SSCP), permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons; Sensible et reproductible; Dispense d'une étape de digestion enzymatique	Réappariement de brins : présence de plusieurs bandes provenant d'une seule espèce
T-RFLP	Polymorphisme de séquences de taille des fragments	Automatisable : permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons; Très sensible et reproductible	Dépend de la performance de la digestion enzymatique; Intérêt de combiner plusieurs enzymes

Source : Martins, (2012)

Plusieurs travaux ont utilisé la DGGE pour étudier des communautés de bactéries endophytes présentes chez différentes plantes (Spiegelman *et al.* 2005 ; Monita *et al.*, 2010 ; Schmid *et al.* 2011 ; Grube *et al.* 2011 ; Martins, 2012).

La DGGE est une technique efficace pour l'étude de la diversité des populations d'endophytes bactériens cultivables et non cultivables présents chez les végétaux (Aaraújo *et al.*, 2002 ; Abreu-Tarazi *et al.*, 2010). Cette méthode fournit une empreinte digitale de la structure de la communauté microbienne présente dans un habitat échantillonné. Dans cette méthode chaque bande de l'empreinte digitale représente un groupe de bactéries ayant des séquences d'ADN ribosomique 16S avec des points de dénaturation similaires (Aaraújo *et al.*, 2002). La DGGE et la TGGE ont été initialement développées dans le domaine médical pour détecter des mutations ponctuelles impliquées dans des maladies génétiques. Par la suite ces techniques ont été utilisées pour des études en écologie microbienne (Muyzer *et al.*, 1993). Le principe de la technique consiste en une migration de fragments d'ADN sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, entraînant ainsi une séparation des brins. La dénaturation peut être faite en fonction d'un gradient chimique utilisant le formamide ou l'urée (DGGE) ou d'un gradient de température (TGGE). La mobilité électrophorétique d'une molécule double-brin ou complètement dénaturée dans un gel de polyacrylamide est beaucoup plus importante que celle d'un fragment composé en partie de la double hélice classique et en partie de deux simples-brins. Afin d'éviter la dénaturation totale des produits PCR et par conséquent leur élution du gel, une structure à très haute température de fusion, le « GC clamp » est associée à l'ADN lors de l'amplification (Myers *et al.*, 1985). Les propriétés de ces fragments, en ce qui concerne leur longueur et leur constitution nucléotidique (notamment leur contenu en GC), vont déterminer leur comportement migratoire générant ainsi des profils.

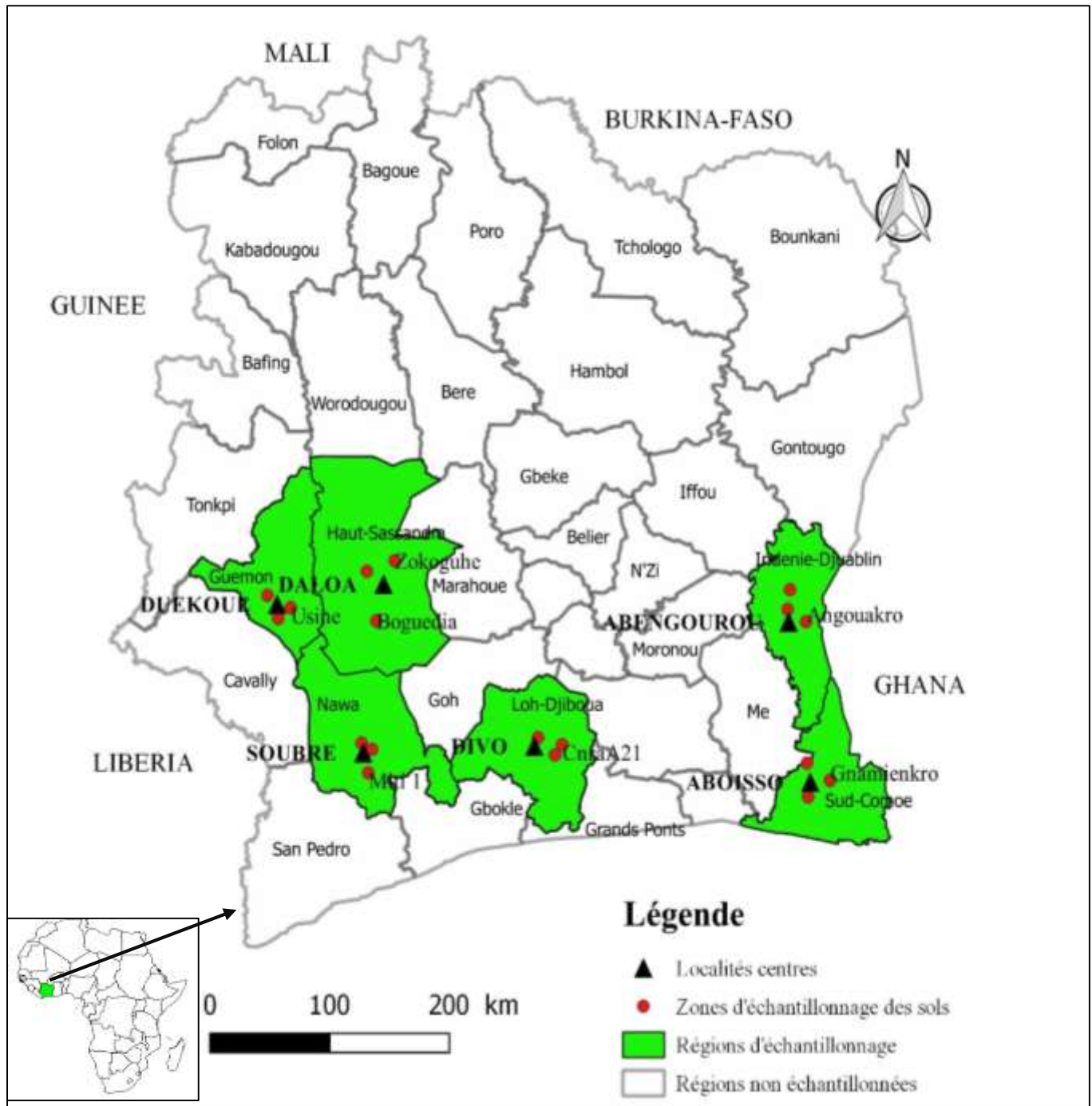
Ces méthodes sont très sensibles, permettant de distinguer deux fragments divergents d'une seule paire de bases (Muyzer, 1999). Les gels de DGGE/TGGE offrent la possibilité d'exciser des bandes d'intérêt et de les séquencer, sachant que du fait de la petite taille des fragments amplifiés, l'information relative à la séquence reste toujours limitée. Cette technique présente l'inconvénient d'être longue et laborieuse à mettre en œuvre et ne permet pas de résoudre les séquences très riches en GC et les écosystèmes complexes (Wu *et al.*, 1999). La DGGE est une alternative à l'étude des schémas de diversité primaire; cependant, la méthode de séquençage du métagénome reste le meilleur choix pour déterminer le profil endophytique des plantes (Pei *et al.*, 2017). Il est essentiel

d'utiliser des approches multiphasiques pour étudier les microorganismes cultivables et non cultivables (Pei *et al.*, 2017). Plusieurs plates-formes de séquençage massif parallèle, à savoir le séquençage de nouvelle génération (NGS) ont révolutionné la détection microbienne en offrant une plus grande compréhension et une détection des espèces rares. Ces plates-formes de nouvelle génération incluent la technologie de pyroséquençage et l'instrument IG de Solexa, récemment repris par Illumina et développé en tant que « Genome Analyzer 2 » (Snyder *et al.*, 2009). Un troisième concurrent sérieux est la plate-forme SOLiD d'ABI. Ces nouvelles technologies effectuent des dizaines de milliers (ou plus) de réactions de séquençage dans un seul tube à essai (Studholme *et al.*, 2011).

DEUXIÈME PARTIE :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chapitre 4 : Zone d'échantillonnage

Les échantillons de sols sous cacaoyères ont été collectés dans six régions productrices. Dans ces régions les localités d'échantillonnages ont été Aboisso (région du Sud-comoe), Abengourou (région de l'Indénié-djuablin), Daloa (région du haut-Sassandra), Divo (région du Lôh-Djiboua), Duékoué (région du Guémon) et Soubré (région de la Nawa). Dans chaque région trois échantillons de sols ont été collectés à une distance d'au moins 15 kilomètres de la localité centre (Figure 12). Ainsi, les sites d'échantillonnage de la localité d'Aboisso ont été Tiéfidougou, Gnamienkro et Krindjabo. Les sites échantillonnés dans la localité d'Abengourou ont été la parcelle expérimentale de la station du CNRA, Akréssi et Angouakro. Les sites échantillonnés dans la localité de Daloa ont été Zaïbo, Zokoguhé et Boguédia. Dans la localité de Duékoué, les sites échantillonnés ont été Djawin, Usine et Bahé. Dans la localité de Soubré les sites échantillonnés ont été Kolabadougou, Logboya et Miti 1. Enfin, les sites échantillonnés dans la localité de Divo ont été les parcelles A21 et E6/5 de la station de recherche du CNRA et Grobiassoumé. La collection des échantillons de sols en milieu paysan a été faite avec la collaboration des planteurs.



Source : Ouattara Adama, 2020

Figure 12 : Régions et sites de collectes des échantillons de sol dans les plantations de cacaoyer

Chapitre 5 : Matériel

Le matériel utilisé dans cette étude a été composé de matériel végétal, d'échantillons de sols, de souches fongiques, de matériel bactérien et de matériel technique (de terrain et de laboratoire).

5-1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé a été composé de feuilles matures saines et de cabosses mûres et immatures de cacaoyers.

5-1-1- Matériel végétal utilisé pour le piégeage des bactéries endophytes

Le matériel végétal utilisé pour le piégeage et l'isolement des bactéries endophytes a été constitué de jeunes plants de cacaoyers. Ces plants ont été cultivés sous une ombrière dans des sachets en polyéthylène contenant les sols collectés dans des cacaoyères de différentes localités productrices. Ces plants ont été obtenus à partir de fèves provenant de cabosses mûres. Ces cabosses sont issues de deux clones Nanay 32 (NA32) et Pound 7 (P7) de la parcelle A21 de Divo et d'un hybride en milieu paysan dans la localité de Daloa (Figure 13). Les clones NA32 et P7 sont respectivement sensible et résistant à la pourriture brune des cabosses. L'hybride est un cacaoyer 'mercedes' issu d'un croisement IFC410×UPA402 (Tahi *et al.*, 2012). Ce matériel a été considéré comme un tout-venant dans cette étude. Les feuilles et les cabosses des clones NA32, PA150, SCA6 et les cabosses du clone P7 ont été prélevées dans le parc à bois de la station de recherche de Divo.

5-1-2- Matériel végétal utilisé pour les tests d'antagonisme *in vitro* et *ex-vivo* contre les espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*

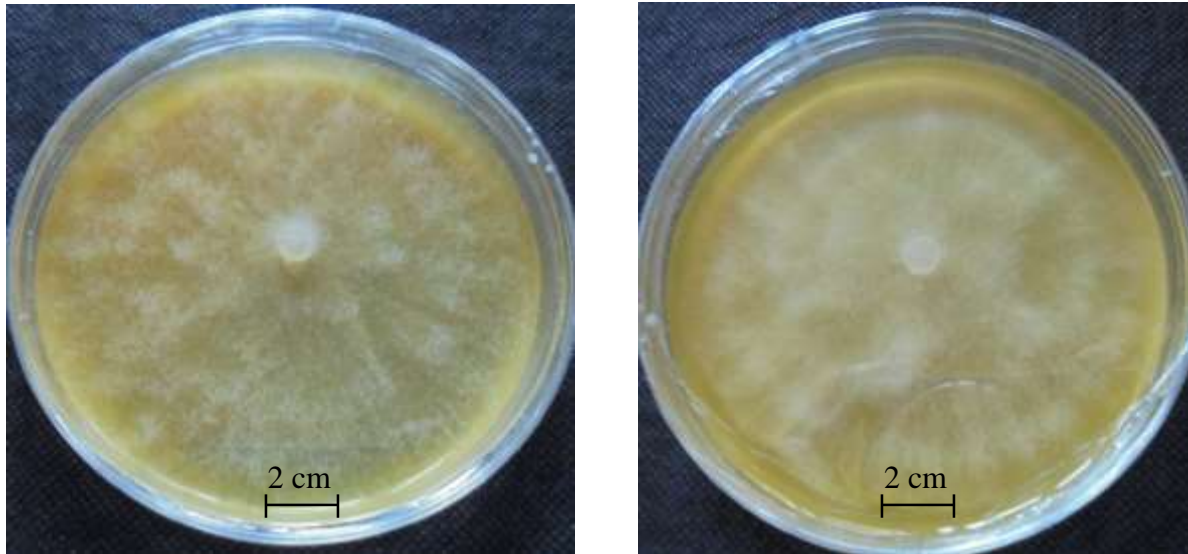
Le matériel végétal ayant servi à la réalisation de ce test a été constitué des feuilles matures saines de trois clones de sensibilité variable vis-à-vis de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer. Il s'agit des clones SCA (Scavina) 6, PA (Parinari) 150 et NA (Nanay) 32 respectivement résistant, moyennement résistant et sensible à la pourriture brune. Ces clones proviennent de deux parcelles A21 et E6/2 de la station de recherche du CNRA (Centre National de Recherche Agronomique) de Divo. Chaque test contre l'une des espèces de *Phytophthora* a nécessité 720 feuilles adultes à raison de 240 feuilles par clone. Des cabosses immatures du clone PA150 ont servi à la réalisation des tests de survie. Ces cabosses ont été prélevées sur des cacaoyers présents sur le site de la station de Bingerville.

5-2- Echantillons de sol

Dix-huit (18) échantillons de sols ont été collectés dans des cacaoyères de six régions productrices de la Côte d'Ivoire. Les localités échantillonnées ont été Aboisso, Abengourou, Daloa, Divo, Duékoué et Soubré (Figure 14). Dans chacune de ces localités trois échantillons composites de sols de 10 kilogrammes chacun ont été prélevés dans l'horizon humifère à une profondeur de 0 à 20 cm sous des cacaoyers. Cette profondeur héberge une activité biologique intense (Kébé *et al.*, 2009). Les prélèvements ont été faits dans des parcelles de cacaoyers en production situées à une distance d'au moins 15 Km des villes centres.

5-3- Matériel fongique

Deux souches fongiques *Phytophthora palmivora* (BL7.11.2) et *Phytophthora megakarya* 13P30.1 (Figure 13) ont été utilisées pour la réalisation des tests d'antagonisme *in vitro* en boîte de Pétri et des tests d'antagonisme *ex-vivo* sur disques foliaires et sur cabosses contre les endophytes bactériens du cacaoyer. Ces souches ont été isolées respectivement en 2000 et en 2013 à partir de cabosses de cacaoyer naturellement atteintes de pourriture brune (Tahi *et al.*, 2000 ; Mpika *et al.*, 2009 ; Coulibaly, 2014). Elles ont été conservées dans des tubes à essai sur milieu de culture petit pois (pp) gélosé inclinés et stockés dans une mycobanque au laboratoire de Phytopathologie du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) à la station de Bingerville. Ces souches ont été réactivées régulièrement sur un milieu frais de petit pois gélosé et leur agressivité a été renouvelée sur des cabosses immatures.



a- Colonie de la souche *Phytophthora palmivora* BL7.11.2

b- Colonie de la souche *Phytophthora megakarya* 13P30.1

Figure 13 : Colonies des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* sur le milieu de culture carotte-agar

(Photos: Ouattara Adama, 2019)

5-4- Matériel bactérien utilisé pour les tests d'antagonisme

Le matériel bactérien utilisé dans les tests d'antagonisme était constitué d'une collection de cent seize (116) bactéries endophytes. Ces bactéries endophytes ont été isolées des jeunes plants de deux clones P (Pound) 7 et NA (Nanay) 32 dont la sensibilité à la pourriture brune est connue respectivement résistant et sensible. Soixante-sept (67) et quarante-neuf (49) isolats bactériens issus respectivement des clones P7 et NA32, ont été utilisés au cours des tests d'antagonisme.

5-5- Matériel technique

Le matériel technique a été constitué de matériel de terrain et de matériel de laboratoire.

5-5-1- Matériel de terrain

Le prélèvement des échantillons de sol sous cacaoyère a nécessité :

- une machette pour débarrasser les arbustes et les racines sur les sites de prélèvement ;
- une daba pour creuser le sol ;
- des sachets plastiques stériles pour le stockage des échantillons de sols ;
- des sacs pour rassembler et stocker les échantillons de sols de la même provenance ;
- un GPS (l'application Sygic version 17.4.28, installée sur Androïde a été utilisée pour les coordonnées géographiques),
- une pelle pour ramasser le sol ;
- du coton pour imbiber d'alcool le matériel de prélèvement ;
- de l'alcool à brûler 90° pour la désinfection du matériel de prélèvement ;
- un arrosoir pour arroser la pépinière ;

Le prélèvement du matériel végétal et son conditionnement au laboratoire ont nécessité :

- un sécateur pour le prélèvement des cabosses et feuilles de cacaoyers ;
- des sachets plastiques pour la conservation de chaque échantillon ;
- une glacière pour la conservation et le transport de l'ensemble des échantillons ;
- un appareil photographique numérique pour les photographies présentées dans ce document ;
- de l'éthanol à 90°, pour la désinfection du matériel.

5-5-2- Matériel de laboratoire

Le matériel technique de laboratoire a été composé :

- de boîtes de Pétri utilisées pour les cultures des bactéries et des souches de *Phytophthora* ;

- de tubes à essai utilisés pour la conservation et la culture des bouillons ;
- de la verrerie (erlenmeyers de 250 mL, béchers, éprouvettes graduées de 10, 100 et 1000 mL et tubes à hémolyse) utilisée pour le rinçage des organes de cacaoiers lors de l'isolement et la préparation des milieux de culture ;
- une balance de précision 10^{-2} (OHAUS Model explorer Pro EP214C) pour les pesées (agar Agar) ;
- des tubes Ependorf de 2 ml, utilisés pour la conservation des isolats dans le glycérol 50 % ;
- d'un congélateur et un réfrigérateur utilisés pour la conservation des produits et des souches bactériennes à -20 °C et à 4 °C ;
- d'un vortex pour homogénéiser les solutions ;
- d'une plaque chauffante pour faire fondre l'agar ;
- d'un bec Bunsen, pour maintenir l'asepsie ;
- des micropipettes (P20 et P1000) et des cônes de 20 et 1000 μL pour prélever les volumes infiniment petits ;
- d'un mixeur pour écraser le mica ;
- d'une étuve pour l'incubation des milieux de culture ;
- d'une autoclave pour la stérilisation des milieux et matériels ;
- une trousse de culture (scalpel, aiguille lancéolée, precelles, emporte-pièce) pour la culture des bactéries endophytes et des souches de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya* ;
- un microscope photonique pour les observations microscopiques des bactéries endophytes et le comptage des zoospores de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya* ;
- un hématimètre (cellule de Malassez) pour le calibrage de la suspension de zoospores ;
- une étuve (BINDER Model ED53) pour le séchage de la verrerie ;
- des fioles de Roux pour la culture des souches de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya* et la production des zoospores ;
- des bacs, de la mousse (épaisseur 1 cm) et du film plastique noir, pour réaliser les tests d'antagonisme sur des disques foliaires ;
- un emporte-pièce de diamètre 15 mm pour découper les disques foliaires ;
- des micropipettes pour l'inoculation des disques foliaires ;
- de l'éthanol à 90 ° , pour la désinfection du matériel lors des manipulations ;

- une hotte à flux laminaire pour la culture des souches de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya*.

5-6- Milieux de culture

Tableau III : Différents milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'étude des caractères cultureux des bactéries endophytes du cacaoyer

Types de milieux de culture	Usage	Références
PCA (Plate count agar)	milieu complet, pour isoler les bactéries endophytes	Konaté <i>et al.</i> , 2015 b
YEMA (Yeast extract mannitol agar)	sélectionner les bactéries Rhizobia capables de fixer l'azote atmosphérique	Konaté <i>et al.</i> , 2015 b
Milieu PVK	sélectionner les bactéries endophytes capables de solubiliser le phosphate	Pikovkaya, 1948
Milieu Aleksandrov	sélectionner les bactéries endophytes capables de solubiliser le potassium	Aleksandrov <i>et al.</i> , 1967
Gélose Mossel	sélectionner des bactéries endophytes appartenant au genre <i>Bacillus</i>	Priest <i>et al.</i> , 2004
Gélose au cétrimide	sélectionner les bactéries appartenant au genre <i>Pseudomonas</i>	Delarras, 2007
International Streptomyces Project (ISP1, ISP2 ISP4)	sélectionner des bactéries endophytes présentant les caractères cultureux des	Zaitlin <i>et al.</i> , 2003 ; Kaioua, 2015
Gausse et SMK (krasilnikov's synthetic)	sélectionner des bactéries endophytes présentant les caractères cultureux des	Zaitlin <i>et al.</i> , 2003 ; Kaioua, 2015
Milieu petit pois gélosé (pp)	culture <i>in vitro</i> des <i>Phytophthora</i> et la production des zoospores	Mpika <i>et al.</i> , 2009
Milieu carotte gélosé (CA)	tests d'antagonistes	Mpika <i>et al.</i> , 2009

Chapitre 6 : Méthodes

Différentes méthodes ont été utilisées pour faire l'échantillonnage des sols, la mise en place de la pépinière de cacaoyers, l'isolement des bactéries endophytes, la culture des zoospores des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*. De même des méthodes de caractérisation phénotypique ont été utilisées pour étudier les isolats bactériens collectés et pour étudier l'antagonisme entre les bactéries endophytes et les deux souches de *Phytophthora*.

6-1- Prospection et collecte des échantillons de sols

Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions aseptiques pour éviter la contamination des échantillons entre eux. A cet effet, après chaque prélèvement le matériel a été nettoyé avec du coton imbibé d'alcool 90° puis enflammé (trois fois). Les prélèvements ont été effectués dans les couches supérieures d'environ 0-20 cm de profondeur sous les cacaoyers (Kébé *et al.*, 2009). Avant tout prélèvement les feuilles mortes de cacaoyer ont été dégagées. Chaque échantillon d'environ 10 kg de sol a été obtenu par un mélange de cinq échantillons d'au moins 2 kg chacun prélevés sur les quatre extrémités et le centre d'une parcelle dont la superficie a été d'au moins un hectare de cacaoyers en production selon le protocole de GenoSol (2015). Enfin, chaque échantillon composite a été marqué par les coordonnées géographiques (Latitude, Longitude, Altitude) de la parcelle et la date de collecte. Les échantillons ont été collectés en mars 2018 en début de saison pluvieuse. Les échantillonnages ont été effectués dans des parcelles en monoculture dont l'âge des cacaoyers était d'au moins 3 ans. A l'exception des parcelles de la localité de Daloa où l'âge des cacaoyers était d'au moins 15 ans.

6-2- Mise en place de la pépinière

Les sols collectés dans les différentes localités des régions productrices ont été mis dans des sachets en polyéthylène perforés dans leur moitié inférieure et de dimension 5 cm x 10 cm x 15 cm. Ces sols ont été ensuite disposés sous une ombrière (Figure 14). Les fèves des trois variétés de cacaoyers ont été semées dans ces sols puis arrosées 2 fois par jour pendant 45 jours excepté les jours où il y a eu de la pluie.

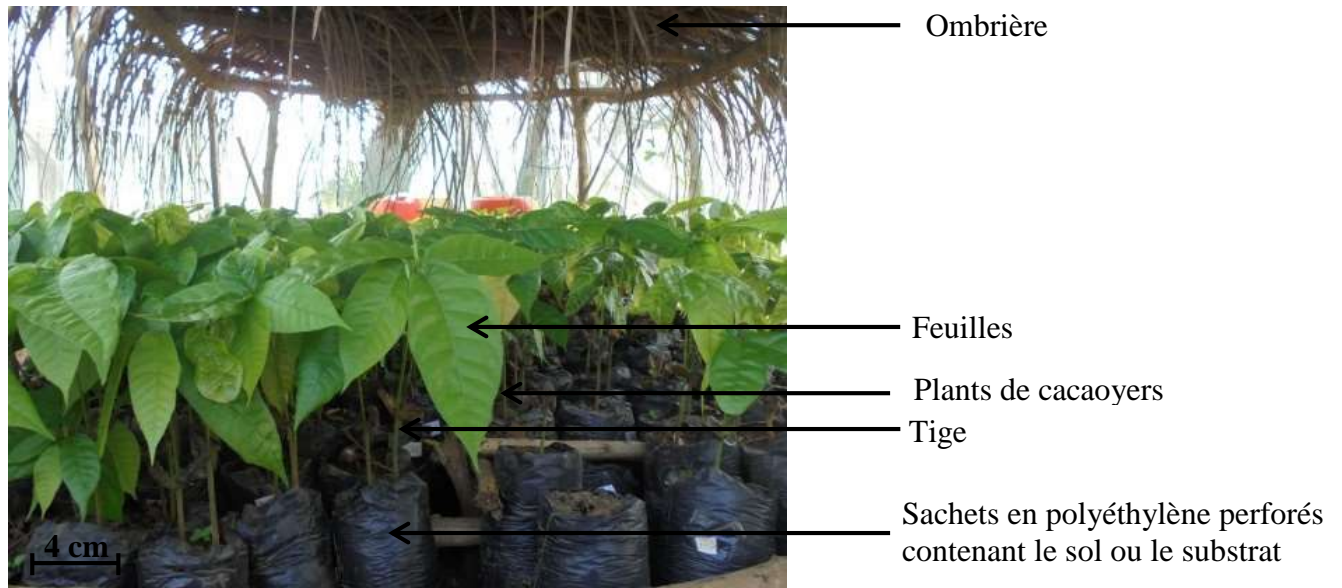


Figure 14 : Pépinière de cacaoyer pour le piégeage des rhizobactéries indigènes

(Photo : Ouattara Adama, 2018)

6-3- Isolement des bactéries endophytes

Pour l'isolement des bactéries endophytes, des plants de cacaoyers âgés de 45 jours ont été arrachés des sachets plastiques (Figure 15). Les différents organes que sont les tiges, les feuilles et les racines ont été utilisés comme matrices selon la méthode de Konaté *et al.* (2015 b).

6-3-1- Isolement à partir des racines des jeunes plants de cacaoyers

Un gramme (1g) de racines de chaque échantillon a été découpé et rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Des désinfections successives à l'éthanol à 70 % pendant 5 minutes, suivie de l'hypochlorite de sodium (eau de javel 8°Chl) à 25 % pendant 5 minutes puis à l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % pendant 10 min ont été appliquées (Muzzamal *et al.*, 2012 ; Konaté *et al.*, 2015 b). Ensuite, les organes ont été rincés abondamment à l'eau distillée stérile et broyés dans 1 mL d'eau distillée stérile contenue dans des tubes à hémolyse. Pour la numération des bactéries, un volume de 0,1 mL de broyat dilué 20 fois a été étalé sur la gélose PCA (Plat count agar). La dilution a été faite dans de l'eau distillée stérile contenue dans un épendorf à raison de 0,1 ml de broyat pour un volume final de 2 mL. Pour chaque échantillon trois boîtes de Pétri ont étéensemencées avec la même quantité de 0,1 mL de broyat. Les milieux de culture ont été incubés à l'étuve à 28 °C pendant 5 jours.

6-3-2- Isolement à partir des tiges de jeunes plants de cacaoyers

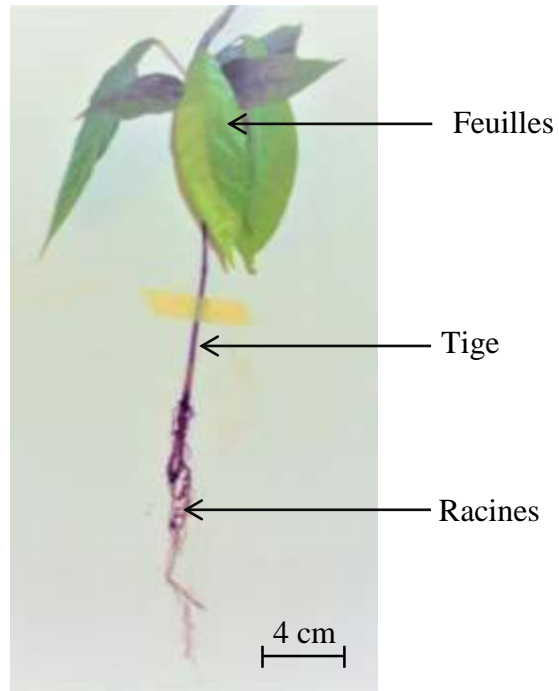
Des morceaux de tiges d'environ 2,5 cm ont été découpés et désinfectés selon la procédure de Konaté *et al.* (2015 b). Après rinçage à l'eau distillée stérile, ces morceaux de tiges ont été sectionnés transversalement en petits morceaux à l'aide d'une lame stérile et ces morceaux ont été étalés sur la gélose PCA (Plat count agar). Les cultures ont été incubées à 28 °C pendant 5 jours.

6-3-3- Isolement à partir des feuilles de plantules de cacaoyer

Après la stérilisation de surface selon la procédure de Konaté *et al.* (2015 b), 1 g de feuilles ont été mises dans des sachets plastiques stériles contenant de l'eau distillée stérile puis ont été macérées jusqu'à l'obtention d'un broyat. Un volume de 0,1 mL du broyat de feuille dilué 20 fois et a été étalé sur la gélose PCA (Plat count agar). Les cultures ont été incubées à l'étuve à 28°C pendant 5 jours.



a- Déracinement des plants de cacaoyers



b- Différents organes de cacaoyer utilisés comme matrice pour l'isolement des endophytes



c- Désinfection en surfaces des organes de cacaoyers

Figure 15 : Isolement des bactéries endophytes du cacaoyer

(Photos : Ouattara Adama, 2018)

6-4- Numération des densités bactériennes

Toutes les boîtes ont été prises en compte pour le calcul des densités bactériennes au niveau des racines et des feuilles des plants de chaque provenance. Les calculs ont été faits selon la formule ci-dessous (Konaté *et al.*, 2015 a):

$$\text{UFC/g} = \frac{\sum \text{Colonies}}{n \times V_p \times m} \times D \times V_s$$

UFC/g : Unité Formant Colonie par gramme d'organe; n : nombre de boîtesensemencées ; D : facteur de dilution (D =20) ; V_p : volume de broyat prélevé (0,1 mL) ; \sum Colonies : somme des colonies des trois boîtes ; V_s : volume solution mère du broyat (1 mL) ; m : masse de l'organe (racine ou feuille) prélevée (1 g).

6-5- Purification et conservation des bactéries endophytes

Après l'incubation des cultures à 28 °C pendant 5 jours, des colonies bactériennes ont été sélectionnées à partir de caractéristiques morphologiques (taille, couleur, contour des colonies). Ces colonies ont été ensuiteensemencées en boîte de Pétri par strie à l'aide d'une anse de platine stérilisée à la flamme du bec bunsen sur la gélose YEM pour la purification. Les cultures ont été incubées à l'étuve à 28°C pendant 3 jours. Pour les besoins d'études, les isolats bactériens purifiés ont été conservés à 4°C dans des tubes à essai contenant le milieu YEM solide incliné. Ces cultures ont été renouvelées tous les trois mois. La conservation à long terme des isolats purifiés a été faite dans du glycérol (50 %) à - 20°C.

6-6- Caractérisation morphologique des bactéries endophytes

L'identification phénotypique des isolats a porté sur l'étude d'un certain nombre de caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

6-6-1- Examen macroscopique

Cette étude a consisté à l'observation directe à l'œil nu de l'aspect morphologique des colonies obtenues sur la gélose YEM après 72 h d'incubation, en tenant compte des critères suivants : la forme des colonies (circulaire, point ou rhizoïde) ; la taille des colonies par mesure de diamètre, la couleur, l'élévation (convexe, concave, plate) ; l'opacité (opaque, translucide ou transparente), l'aspect de la surface (lisse, rugueuse ou dentelée) et la bordure (lobée ou régulière).

6-6-2- Identification microscopique

L'étude microscopique a consisté à l'observation d'une partie des colonies purifiée afin de noter le mode de regroupement, la présence ou non de mycélium. L'observation a été faite entre lame et lamelle au grossissement (GX 400).

6-6-3- Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle qui permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté et la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. La coloration de Gram de tous les isolats a été réalisée selon la méthode classique. A cet effet, à partir de pré-culture de chaque isolat, des frottis ont été réalisés sur des lames (à l'aide d'une anse en platine) puis fixer à la chaleur. Ces lames ont été recouvertes par le violet de gentiane (pendant 1 minute) puis d'une solution iodée ou lugol (pendant 1 minute), quelques gouttes d'alcool-acétone et la fuschine (pendant 30 secondes). Chaque étape a été suivie d'un rinçage à l'eau distillée. Après séchage les lames colorées ont été observées au microscope (GX 1000) (en ajoutant de l'huile à immersion sur les lames). Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet alors que les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

6-7- Caractérisation biochimique

La caractérisation biochimique a consisté à étudier la capacité des isolats bactériens à solubiliser le phosphate tricalcique et le mica, leur capacité à produire les enzymes nitrate réductase et amylase pour réduire respectivement le nitrate de potassium et l'amidon.

6-7-1- Solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Ce test a été réalisé sur le milieu PVK solide (Pikovkaya, 1948) dont la composition est donnée dans l'annexe 3. Un volume de 5 μL d'une suspension bactérienne de pré-cultures fraîches de chaque isolat bactérien a été déposé en duplicata à la surface du milieu PVK solide. Après incubation à $28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 7 jours, les isolats capables de solubiliser le phosphate tricalcique ont été entourés d'un halo transparent. L'indice de solubilisation de chaque isolat efficient a été obtenu en mesurant le diamètre de la colonie et le diamètre du halo qui l'entoure. Les indices de solubilisation du phosphate (ISP) ont été ensuite calculés selon la formule suivante (Angraini *et al.*, 2016) :

$$\text{ISP (\%)} = \frac{\text{Diamètre de l'halo} - \text{Diamètre de la colonie}}{\text{Diamètre de la colonie}} \times 100$$

6-7-2- Solubilisation du potassium (mica)

Le test de solubilisation du potassium a été réalisé sur le milieu de culture Aleksandrov modifié dont la composition est donnée en Annexe 4 (Aleksandrov *et al.*, 1967). Un volume de 5 µL de suspensions bactériennes issues de pré-cultures fraîches de chaque isolat, a été déposé en duplicata à la surface du milieu Alexandrov solide. Après incubation à 28 ± 2 °C pendant 3 jours, le diamètre de la colonie et le diamètre du halo qui l'entoure ont été mesurés (Parmar *et al.*, 2016). L'indice de solubilisation du potassium (ISK) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{ISK (\%)} = \frac{\text{Diamètre de l'halo} - \text{Diamètre de la colonie}}{\text{Diamètre de la colonie}} \times 100$$

6-7-3- Réduction du nitrate de potassium

La capacité des souches à réduire le nitrate de potassium (KNO₃) a été évaluée par la détermination de leur croissance sur gélose YEM additionné individuellement et séparément de nitrate de potassium (KNO₃) à différentes concentrations de (0 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 % *p/v*). Les boîtes de Pétri ont été inoculées avec des pré-cultures bactériennes préparées sur le milieu de culture YEM liquide. La croissance des bactéries a été estimée par l'importance du diamètre de la colonie, en comparaison à des témoins sans nitrate de potassium.

6-7-4- Recherche de l'activité amylasique

L'activité amylasique des isolats a été détectée sur la gélose YMA à base d'amidon. Dans ce milieu de culture le mannitol a été remplacé par l'amidon (Annexe 1). Pour ce test, une culture bactérienne de chaque isolat a été préparée préalablement. Une seule colonie a été prélevée aseptiquement à l'aide d'une anse stérile à partir d'une culture. Cette colonie a étéensemencée dans un tube contenant le milieu de culture YEM liquide. Ensuite, cette culture a été incubée sous agitation pendant 3 jours à 28 ± 2 °C. Après trois jours de culture, un volume de 10 µL de chaque suspension a étéensemencé par touche sur des milieux de culture YMA solidifiés. Après incubation à 28 ± 2 °C pendant 72 heures, la révélation a été faite par ajout de 3 mL d'une solution iodée sur les milieux de culture pendant 15 minutes, suivie par deux rinçages à l'eau distillée (Aneja, 2006 ; Baghya *et al.*, 2019). L'hydrolyse de l'amidon, en milieu solide par un microorganisme, se traduit par un halo

clair autour de la colonie. Si les microorganismes sont amylase négative, le milieu reste inchangé et uniformément opalescent (Sodhi, 2005).

6-8- Caractérisation physiologique

La caractérisation physiologique a consisté à étudier la tolérance des isolats bactériens à la salinité, au nitrite de sodium, aux engrais (NPK et urée), et au pH. Pour tous ces tests une échelle a été adoptée pour estimer la tolérance des isolats bactériens. Les symboles (+++) ; (++) ; (+) et (-) ont été utilisés. Ces symboles traduisent : une forte croissance (+++), une croissance moyenne (++) , une faible croissance (+) et une absence de croissance (-). Les isolats bactériens affectés des symboles (+++) et (++) sont considérés comme tolérants et ceux affectés de (+) ou (-) sont considérés comme étant sensibles.

6-8-1- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens à la salinité (NaCl)

La tolérance des isolats bactériens au stress salin a été étudiée sur gélose YEM additionnée de chlorure de sodium (NaCl) à différentes concentrations (0 à 10 %). Les boîtes de Pétri ont été inoculées à partir des pré-cultures bactériennes préparées sur le milieu de culture YEM liquide. La croissance relative des bactéries a été estimée par l'importance du diamètre de la colonie en comparaison à des témoins sans chlorure de sodium (Missbah *et al.*, 1996 ; Konaté *et al.*, 2015 b).

6-8-2- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens au nitrite de sodium (NaNO₂)

La capacité des isolats bactériens à réduire le nitrite de sodium a été également évaluée par détermination de la croissance sur le milieu de culture YEM solide additionné de nitrite de sodium (NaNO₂) à des concentrations de 0,25 ; 0,50 et 0,75 % (*p/v*). Les boîtes de pétri ont été inoculées à partir des pré-cultures bactériennes préparées sur le milieu de culture YEM liquide. La croissance relative des bactéries a été estimée par l'importance du diamètre de la colonie en comparaison à des témoins sans nitrite de sodium (Ouattara, 2015).

6-8-3- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens à l'urée

Ce test a été réalisé sur le milieu de culture YEM solide contenant des concentrations d'urée allant de 2 ; 4 et 6 % (*p/v*). Ces milieux ont étéensemencés avec 10 µL de la pré-culture de chaque isolat. La croissance relative des bactéries a été estimée par l'importance du diamètre de la colonie en comparaison à des témoins sans l'urée (Missbah *et al.*, 1996 ; Dixit *et al.*, 2014).

6-8-4- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens à l'engrais chimique NPK (0-23-19)

La tolérance des souches étudiées en présence du NPK a été évaluée par détermination de la croissance sur milieu de culture YEM solide additionné au NPK à des concentrations de 0 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 % (*p/v*). Les boîtes de pétri sont inoculées à partir des pré-cultures bactériennes préparées sur milieu de culture YEM liquide (Konaté *et al.*, 2015 b). La croissance relative des bactéries a été estimée par l'importance du diamètre des colonies en comparaison à des témoins.

6-8-5- Test d'évaluation de la tolérance des isolats bactériens au pH

L'effet du pH a été évalué sur le milieu de culture YEM solide à différents pH (3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12). Les pHs acides ont été ajustés avec une solution molaire (1 M) d'acide chlorhydrique (HCl) tandis que les pHs basiques ont été ajustés avec une solution molaire (1 M) d'hydroxyde de sodium (NaOH). Après ajustement des pHs, les milieux ont été autoclavés à 121°C pendant 20 min. Une fois solidifiés les milieux ont été inoculés avec 10 µl de pré-culture de chaque isolat (Konaté *et al.*, 2015 b).

6-9- Effet des stress abiotiques sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Les effets de stress abiotiques tels que les métaux lourds, le chlorure de sodium (NaCl) et le pH sur la capacité des isolats bactériens à solubiliser le phosphate tricalcique ont été étudiés.

6-9-1- Effet des métaux lourds sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Ce test a permis d'évaluer à la fois la tolérance des isolats aux métaux lourds et aussi l'influence des métaux lourds sur la capacité des bactéries à solubiliser le phosphate tricalcique. Les métaux lourds utilisés étaient : le chlorure d'aluminium (AlCl_3), le chlorure de cadmium (CdCl_2), le chlorure de cobalt (CoCl_2), le sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$), l'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2,3\text{H}_2\text{O}$) et le sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$). Ces métaux lourds ont été ajoutés individuellement à différentes concentrations de (0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 10 ; 25 et 50 µg.mL⁻¹) au milieu PVK puis autoclavé (Konaté *et al.*, 2014 a ; Konaté *et al.*, 2015 b ; Divakar *et al.*, 2018 ; Yahaghi *et al.*, 2018). Après solidification les milieux ont été inoculés avec 10 µL de pré-culture d'isolats bactériens. Quarante-cinq (45) isolats bactériens ont été testés. Ces isolats ont été préalablement sélectionnés comme étant les plus efficaces, avec des indices de solubilisation du phosphate tricalcique supérieurs ou égaux à 70 %. Après 3 jours d'incubation à 28 °C, les halos de

solubilisation du phosphate tricalcique ont été mesurés puis le calcul des indices a été effectué pour chaque isolat (Konaté *et al.*, 2014 b; Divakar *et al.*, 2018 ; Yahaghi *et al.*, 2018). Pour les témoins les isolats bactériens ont été ensemencés sur des milieux PVK normaux c'est-à-dire sans métaux lourds et le phosphate tricalcique a été ajouté à la concentration de 5 g / L.

6-9-2- Effet de la salinité (NaCl) sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

L'effet de la salinité sur la capacité des isolats à solubiliser le phosphate tricalcique a été évalué par ajout de différentes concentrations (2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 %) de chlorure de sodium (NaCl) au milieu PVK. Après stérilisation à l'autoclave, les milieux solidifiés ont été inoculés avec 10 μL de pré-culture de chaque isolat. Les témoins ont été inoculés sur des milieux de culture PVK normaux. Les milieux ont été ensuite incubés à 28 °C pendant 3 jours. La mesure des halos de solubilisation et des diamètres des colonies bactériennes a permis de calculer les indices de solubilisation (Joe *et al.*, 2016. Divakar *et al.*, 2018). Pour les témoins les isolats bactériens ont été ensemencés sur des milieux PVK normaux, le phosphate tricalcique a été ajouté à la concentration de 5 g / L.

6-9-3- Effet du pH sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

L'effet du pH sur la capacité des isolats à solubiliser le phosphate tricalcique a été évalué sur des milieux PVK (Pikovkaya, 1948) solidifiés à différents pH (3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12). Les pH ont été ajustés avec des solutions molaires d'acide chlorhydrique et d'hydroxyde de sodium respectivement pour les pH acides et basiques. Ces géloses ont été inoculées avec les pré-cultures des isolats puis incubés à 28°C pendant 3 jours. La mesure des diamètres des halos de solubilisation et des colonies bactériennes a permis de calculer les indices de solubilisation (Joe *et al.*, 2016. Divakar *et al.*, 2018). Pour les témoins les isolats bactériens ont été ensemencés sur des milieux PVK normaux c'est-à-dire pH est égal à 7,00 et le phosphate tricalcique a été ajouté à la concentration de 5 g / L.

6-10- Identification et caractères cultureux des isolats bactériens d'intérêt agricole

Les isolats d'intérêt agricole ont été soumis à des tests d'identification préliminaire sur des milieux sélectifs pour *Bacillus*, *Pseudomonas* et Actinomycètes. Des tests de catalase ont été aussi réalisés afin d'identifier les isolats capables de produire cette enzyme.

6-10-1- Réaction de la catalase

Une portion de la colonie bactérienne à Gram positif a été prélevée à l'aide d'une anse de platine puis déposée sur une lame porte objet. L'ajout de 2 ou 3 gouttes d'eau oxygénée entraîne une ébullition si la bactérie possède une catalase (Graham & Parker, 1964 ; Cappuccino & Sherman, 1992 ; Prasad *et al.*, 2014). On distingue, les bactéries catalase (+) et les bactéries catalase (-).

6-10-2- Identification et caractères culturels des actinomycètes

Les caractéristiques culturelles des souches telles que la croissance, la couleur du mycélium de substrat et la production de pigments diffusibles ont été observés après 14 jours d'incubation sur les milieux suivants (Annexe 1) : International Streptomyces Project ISP1, ISP2, ISP4 (Athalye *et al.*, 1985), Gausse et SM (Zaitlin *et al.*, 2003; Kaioua, 2015). Seuls les isolats bactériens Gram⁺ ont été testés.

6-10-3- Identification et caractères culturels des *Pseudomonas* sp.

Les *Pseudomonas* ont été identifiés sur un milieu spécifique qui est la gélose au cétrimide. Ce milieu a été préparé en présence du glycérol qui permet d'éviter son oxydation. L'identification a été réalisée selon la méthode utilisée par Delarras (2007). Les isolats bactériens à Gram négatif ont été retenus pour cette identification. Car les bactéries du genre *Pseudomonas* sont Gram⁻. L'ensemencement de l'inoculum a été fait par étalement d'un volume de 10 µL de pré-culture de chaque isolat à la surface du milieu préparé et les cultures ont été incubées à 30-35 °C à l'étuve pendant 24 à 48 h. Après 48 h d'incubation à 37±2 °C, des colonies bleues à vertes et fluorescentes sous lampe UV (360 nm) sont considérées comme étant *Pseudomonas*.

6-10-4- Identification et caractères culturels des *Bacillus* sp.

La méthode de référence officielle actuellement préconisée pour l'énumération du groupe *Bacillus cereus* est la norme NF EN ISO 7932 (ISO 7932, 2004). Elle permet le dénombrement en surface des souches présomptives de *B. cereus* revivifiable. Une quantité de 10 µL d'une pré-culture fraîchement préparée (préalablement identifié Gram positif et catalase positif) a été étalée sur la gélose Mossel préalablement préparée. Les cultures ont été incubées à 30±1 °C pendant 24 à 48 heures. Les colonies caractéristiques du groupe *B. cereus* sont rugueuses, sèches, roses (mannitol négatif), entourées d'un halo de précipitation de couleur rose et d'une zone transparente indiquant la production d'une lécithinase (Priest *et al.*, 2004).

6-11- Tests d'antagonisme *in vitro* des bactéries endophytes contre les espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*

Les tests d'antagonisme *in vitro* ont été réalisés dans le but de sélectionner les bactéries endophytes qui exercent un effet d'inhibition sur la croissance mycélienne des deux souches de *Phytophthora*. Ces tests ont consisté à une confrontation directe des bactéries endophytes avec chacune des souches *Phytophthora palmivora* ou *Phytophthora megakarya*. Donc des cultures mixtes ont été réalisées sur des milieux carotte agar. C'est-à-dire en confrontant les souches de *Phytophthora* et les bactéries endophytes dans des boîtes de Pétri sur le même milieu de culture.

6-11-1- Confrontation *in vitro* des bactéries endophytes et *Phytophthora palmivora*

Les bactéries ont été inoculées sous forme de stries rectilignes divisant les boîtes de Pétri en deux parties égales (Melnick *et al.*, 2011). Deux disques de mycélium calibrés à 5 mm de diamètre ont été prélevés sur une culture pure de *Phytophthora palmivora* à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé au bec Bunsen, et placés de chaque côté de la strie bactérienne à 1 cm du bord de la boîte de Pétri. Les boîtes témoins n'ont pas étéensemencées avec les bactéries. Les cultures ont ensuite été incubées dans l'obscurité à 26 °C. Après 24 heures, les premières observations ont été faites. La période d'incubation a été prolongée à 30 jours pour contrôler la stabilité des résultats obtenus lors de ces tests. Tous les tests ont été réalisés en trois répétitions.

6-11-2- Confrontation *in vitro* des bactéries endophytes et *Phytophthora megakarya*

Les bactéries ont été inoculées sous forme de stries rectilignes divisant les boîtes de Pétri en deux parties égales (Melnick *et al.*, 2011). Deux disques de mycélium calibrés à 5 mm de diamètre ont été prélevés sur une culture pure de *Phytophthora megakarya* à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé au bec Bunsen. Et placés de chaque côté de la strie bactérienne à 1 cm du bord de la boîte de Pétri. Les boîtes témoins n'ont pas étéensemencées avec les bactéries. Les cultures ont ensuite été incubées dans l'obscurité à 26 °C. Après 24 heures, les premières observations ont été faites. La période d'incubation a été prolongée à 30 jours pour contrôler la stabilité des résultats obtenus lors de ces tests. Tous les tests ont été réalisés en trois répétitions.

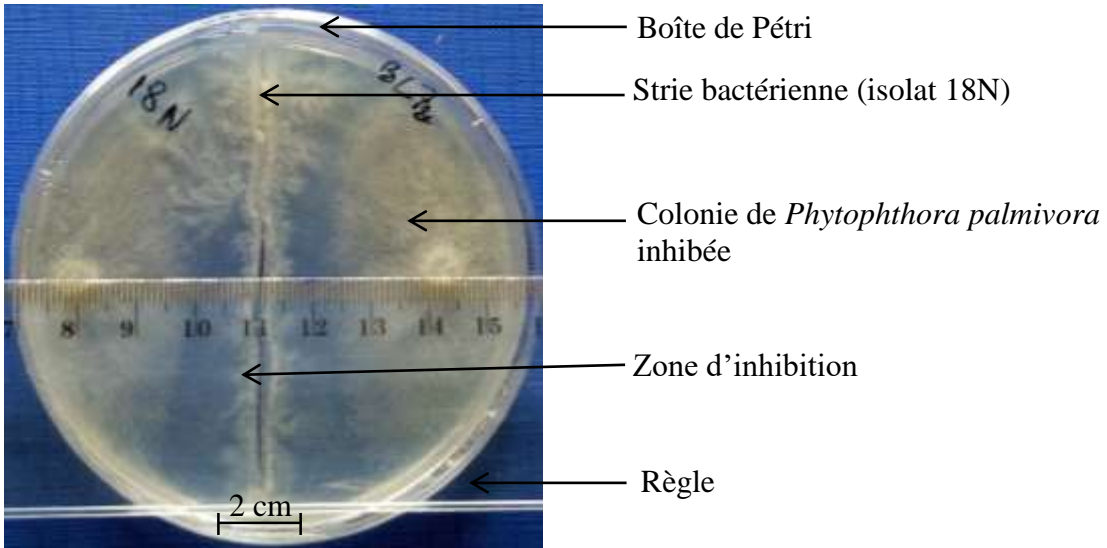
6-11-3- Calcul des Taux d'inhibition (T.I.)

L'estimation de la croissance mycélienne a consisté à mesurer quotidiennement (chaque 24 heures) le diamètre des colonies mycéliennes des *Phytophthora* à l'aide d'une règle (Figure 16). Et cette

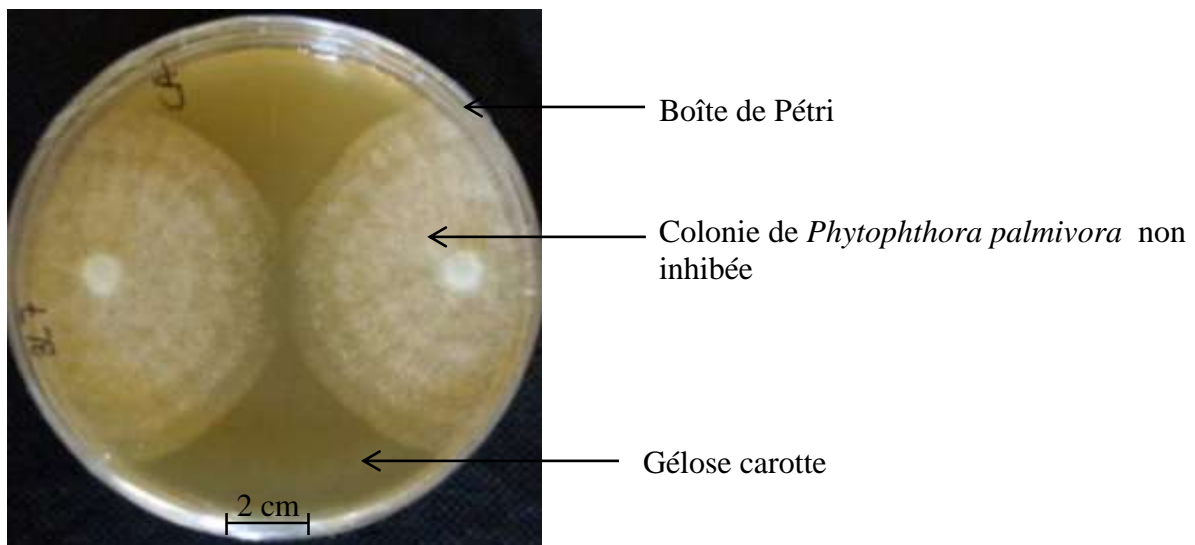
mesuration s'est achevée lorsque l'une des colonies a couvert l'ensemble de la boîte. Au cours de cette expérimentation, trois répétitions ont été effectuées pour chaque test. L'évaluation de l'indice d'inhibition exercée par la bactérie a été estimée par le calcul du taux d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Melnick *et al.*, 2011; Akrofi *et al.*, 2017).

$$\text{T.I. (\%)} = \left(1 - \frac{D_n}{D_t}\right) \times 100$$

T.I. : Taux d'inhibition ; D_n : diamètre moyen des colonies en présence de la bactérie et D_t : diamètre moyen des colonies témoins.



a- Mesure de la croissance du mycélium du genre *Phytophthora* en présence d'une bactérie endophyte antagoniste



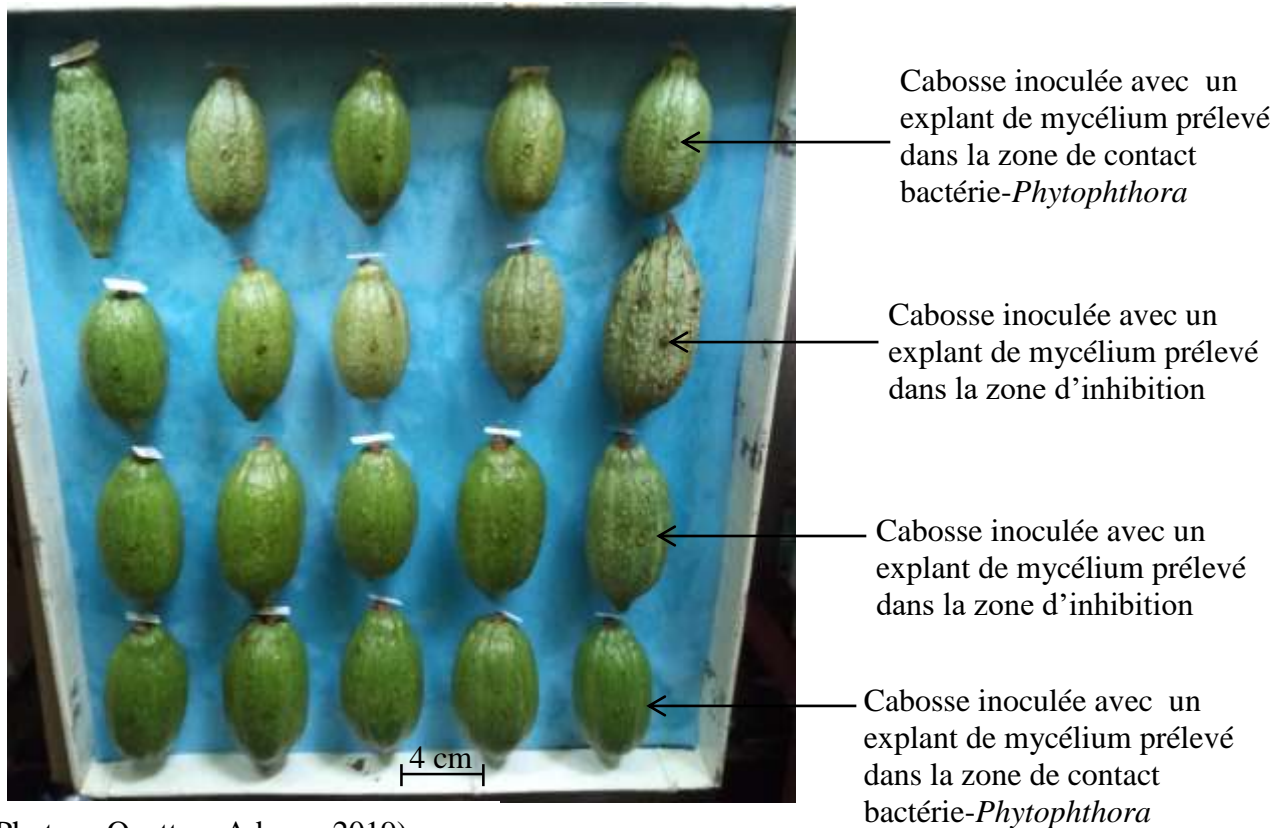
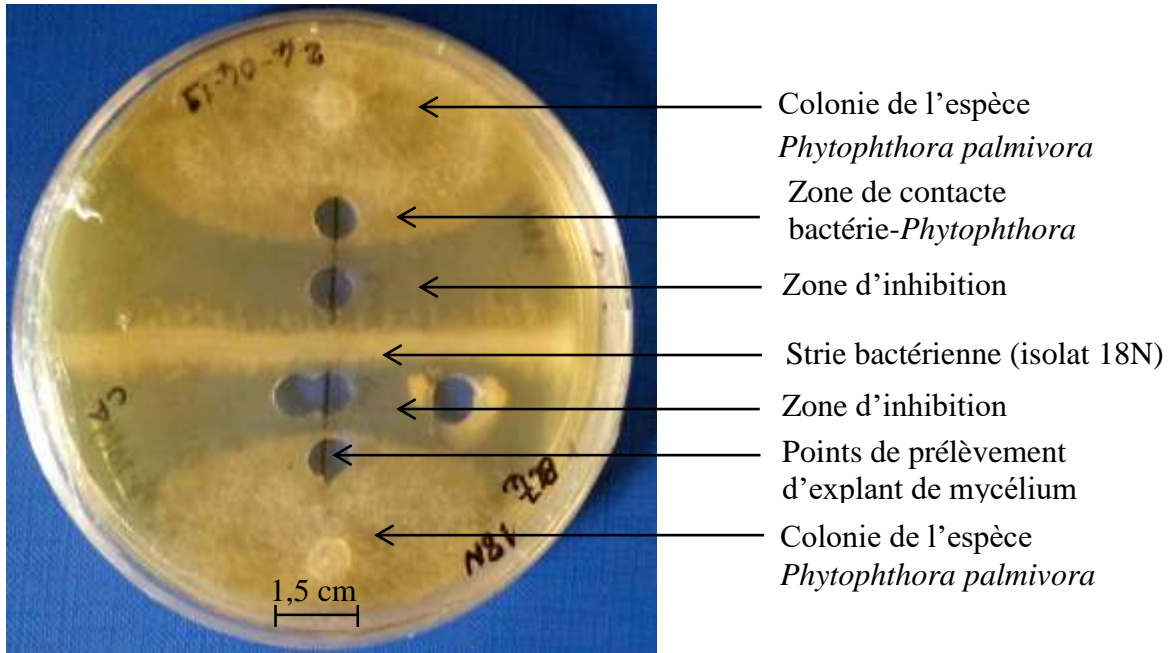
b- Croissance normale de l'espèce *Phytophthora palmivora* en absence de bactérie antagoniste (Exemple de témoin)

Figure 16 : Mesure de la croissance mycélienne du genre *Phytophthora* (Ouattara *et al.*, 2020)

(Photos : Ouattara Adama, 2019)

6-11-4- Test de survie des espèces *Phytophthora megakarya* et *Phytophthora palmivora* sur les cabosses

Après trente jours de confrontation, le mycélium des boîtes des isolats bactériens ayant eu un taux d'inhibition supérieur ou égal à 59 % avec les deux souches de *Phytophthora* a été testé sur cabosse blessée pour voir la survie du pathogène. Des disques d'explants mycéliens de 5 mm de diamètre ont été prélevés suivant une ligne sur les fronts de contact du mycélium et des colonies bactériennes. Quatre explants ont été prélevés pour chaque isolat. Sept isolats bactériens ont été testés dont 48P, 18N, 42P, 60P, 47P, 23P et 11P. Les explants prélevés ont été ensemencés dans des cabosses blessées à l'aide de l'emporte-pièce. Les cabosses ont ensuite été disposées dans des bacs sur des mousses imbibées d'eau distillée (Figure 17). Les bacs ont été fermés à l'aide de bâches noires et ont été incubés à 26 °C pendant sept jours (Mpika *et al.*, 2009).



(Photos : Ouattara Adama, 2019)

Figure 17 : Test de survie du genre *Phytophthora* sur les cabosses de cacaoyers (Kébé *et al.*, 2009 et de Mpika *et al.*, 2009)

6-11-5- Tests feuilles d'antagonisme

Les tests d'antagonisme ont été réalisés par inoculation des disques foliaires de trois clones de cacaoyers avec les inoculum bactériens (des isolats : 23P, 48P, 60P et 18N) et fongiques (*Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*).

6-11-5-1- Préparation d'inoculum des endophytes bactériens

La pré-culture de chaque isolat bactérien a été réalisée sur un milieu de culture petit pois liquide. Après quarante-huit (48) heures d'incubation, les suspensions (10^9 UFC / mL) ont subi une série de dilution (1:10) dans de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration finale de 10^6 et de 10^3 UFC / mL.

6-11-5-2- Préparation d'inoculum des zoospores de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya*

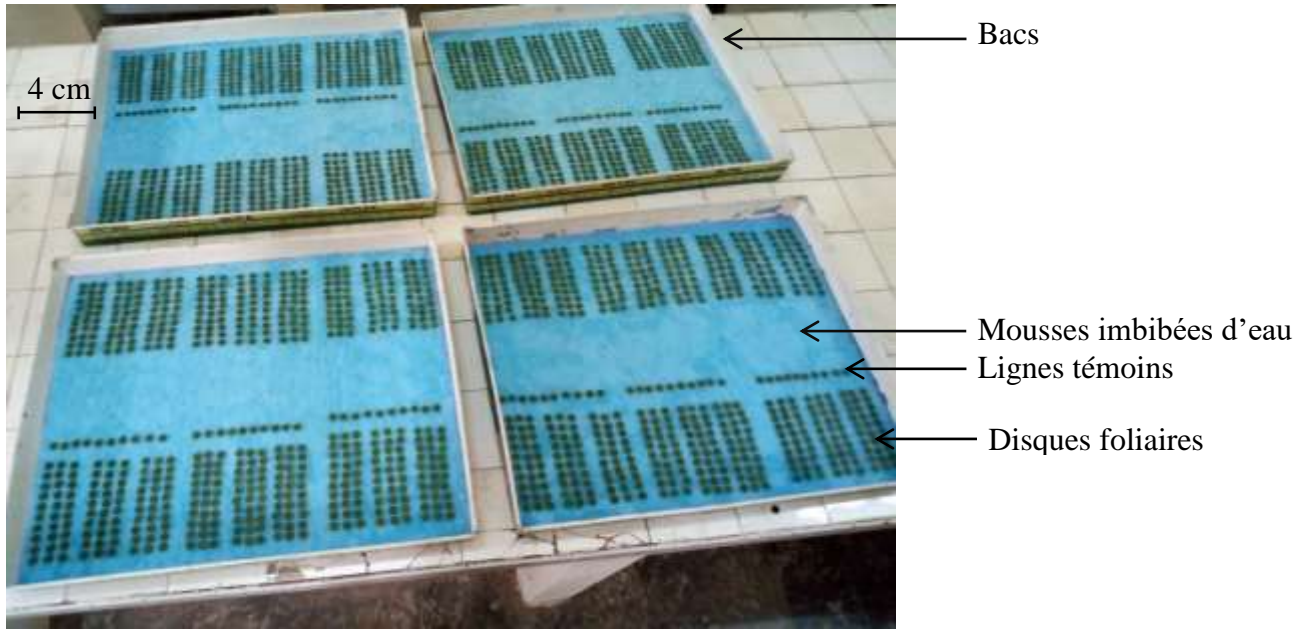
Les suspensions de zoospores des souches *Phytophthora palmivora* (BL7.11.2) et *Phytophthora megakarya* (13P30.1) ont été obtenues à partir de cultures âgées de seize (16) jours dans des fioles de Roux. En effet, après trois jours d'incubation à l'obscurité, les cultures ont été exposées à une photopériode de 12 heures pendant deux semaines. Ces cultures ont ensuite été inondées d'eau distillée stérile puis placées à une température de 4 °C pendant quinze (15) minutes et exposées à la lumière d'une lampe à incandescence pendant quarante-cinq (45) minutes. Enfin, les suspensions de zoospores obtenues ont été dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez et ajustées à la concentration de 3.10^5 zoospores/mL en vue d'effectuer les inoculations sur les disques foliaires (Nyassé *et al.*, 1995 ; Mpika *et al.*, 2009).

6-11-5-3- Dispositif expérimental et technique d'inoculation

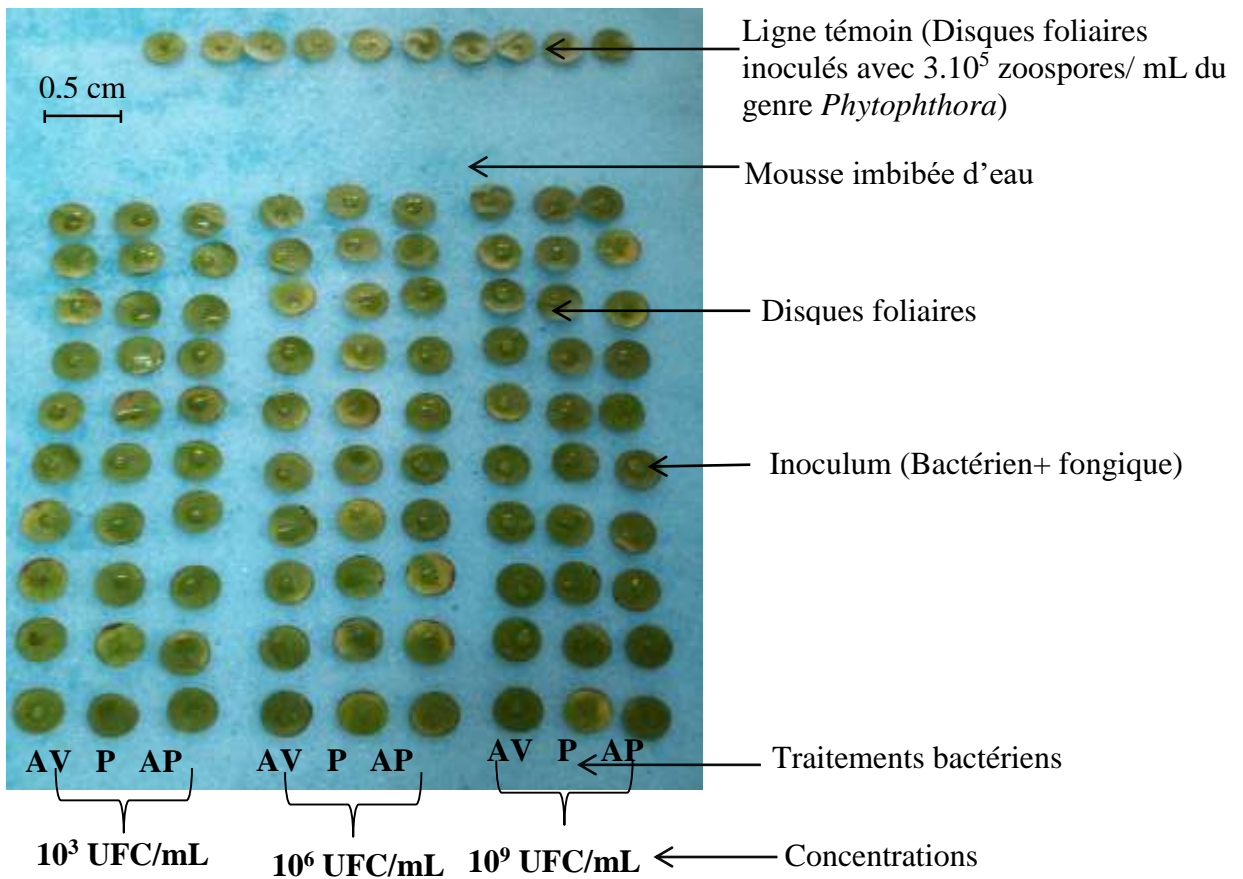
Ce test effectué sur des disques foliaires de 15 mm de diamètre a été conduit pour chaque souche de *Phytophthora* par un dispositif expérimental randomisé split-plot à 4 facteurs (Figure 18) (Chaouch, 2017). Le premier facteur a été la sensibilité des clones. Trois (03) clones de cacaoyer de différentes sensibilités à la pourriture brune ont été testés. Ces clones ont été le NA32, le PA150 et le SCA6 respectivement sensible, moyennement résistant et résistant. Le deuxième facteur a été la capacité des bactéries à inhiber l'apparition de pourriture brune sur les feuilles des trois clones. Pour cela quatre (04) isolats bactériens (60P, 48P, 18N et 23P) pré-sélectionnés dans les tests de confrontation *in vitro* pour un bon taux d'inhibition ont été testés. Le troisième facteur a consisté à évaluer la capacité de différentes concentrations d'inocula bactériens à inhiber l'apparition de la

pourriture brune sur les feuilles des trois clones. Trois (03) concentrations de chaque isolat bactérien ont été testées dont la première concentration $C_1=10^3$, la deuxième concentration $C_2=10^6$ et la troisième concentration $C_3=10^9$ UFC / mL. Enfin, le quatrième facteur a consisté à évaluer l'effet de différentes périodes d'application des inocula bactériens sur l'apparition de la pourriture brune sur les feuilles trois clones de cacaoyer. Trois (3) périodes d'application de l'inoculum bactérien ont été testées. La première période nommée (AV) a consisté à appliquer l'inoculum bactérien une heure (1) de temps avant l'inoculum du *Phytophthora*. La deuxième période nommée (P) a consisté à appliquer simultanément l'inoculum bactérien et celui du *Phytophthora*. Enfin, la troisième période nommée (AP) a consisté à appliquer l'inoculum bactérien une heure (1) de temps après l'inoculum du *Phytophthora*.

Les disques foliaires ont été disposés dans des bacs sur une mousse d'épaisseur (1cm) imbibée d'eau distillée et ont été inoculés avec des aliquotes de 10 μ L de suspensions de chaque pré-cultures bactériennes. Chaque inoculum bactérien a été appliqué des concentrations différentes de 10^3 , 10^6 et 10^9 UFC / mL. Chaque disque a reçu ensuite selon le type de traitement, 10 μ L d'une suspension d'une souche de *Phytophthora* calibrée à 3.10^5 zoospores / mL. Les témoins ont été inoculés uniquement avec les suspensions de zoospores des souches de *Phytophthora* utilisées. Au totale, 36 traitements à raison de 9 traitements par isolat bactérien ont été appliqués aux disques foliaires des trois clones de cacaoyer utilisés. Quatre-vingt-dix (90) disques foliaires par clones, disposés en 3 lignes de 10 disques par type de traitement ont été inoculés avec chaque suspension bactérienne et répartis dans 4 bacs constituant chacun une répétition (Figure 18). Après l'inoculation des disques foliaires, chaque bac a été recouvert d'une bâche noire et incubé à l'obscurité à 26 ± 2 °C pendant 7 jours.



A- Bacs contenant les disques foliaires des trois clones de cacaoyer



B- Mode d'application des traitements bactéries sur les disques foliaires

Figure 18 : Dispositif expérimental

(Photos : Ouattara Adama, 2019)

6-5-4- Lecture des symptômes

La lecture des résultats a été conduite selon l'échelle de Blaha (Nyassé *et al.*, 1995 ; Kébé *et al.*, 2009), dont le score de symptômes de pourriture brune varie de 0 à 5 comme l'indique la Figure 19 (Nyassé *et al.*, 1995 ; Bowers & Tondje, 2006).



Figure 19 : Indices de sensibilité selon l'échelle de Blaha

- 0 = absence de symptôme ;
- 1 = présence des points de pénétration ;
- 2 = présence de points en réseau ;
- 3 = présence de tâche réticulée ;
- 4 = présence de tâche marbrée ;
- 5 = présence de tâche de nécrose vraie.

6-12- Analyses statistiques des données

Toutes les données collectées dans cette étude ont été saisies sous tableur Excel 2010. Les analyses statistiques ont été réalisées sous le logiciel R version 3.5.1 (R Core Team, 2018). L'analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été utilisée pour comparer les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique et du mica par les endophytes bactériens du cacaoyer (selon les provenances des sols, les variétés de cacaoyer et l'organe végétatif dont proviennent les isolats). Cette analyse de la variance a été réalisée selon les moyennes ajustées ou lesmean (Hervé, 2016). Le test non paramétrique de Mood a été utilisé pour comparer les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique des isolats bactériens provenant des trois variétés de cacaoyer et des différents organes des plants de cacaoyer. L'analyse de variance à un facteur a été utilisée aussi pour étudier l'effet des stress abiotiques (métaux lourds, salinité et pH) sur la capacité solubilisatrice des isolats bactériens. Le test de Student-Newman-Keuls a été utilisé pour faire les comparaisons multiples lorsque l'ANOVA a révélé une différence significative au seuil de probabilité 5 %. Par ailleurs, l'analyse en composante principale (ACP) a permis de mettre en évidence les isolats bactériens les plus tolérants et capables de solubiliser le phosphate tricalcique sous stress des métaux lourds. Les packages FactoMiner et FactoShiny de R ont permis de faire les graphiques de l'ACP sous R.

Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne ont subi une transformation arcsinus (racine carré) pour les ajuster à la loi normale (Gomez & Gomez, 1984), puis ont été soumis avec les données des indices moyens de sensibilité à la pourriture brune des tests feuilles, à une analyse de la variance (ANOVA) selon la procédure PROC GLM (Process of General Linear Model) sous le logiciel SAS[®] version 9.4 (SAS, 1995). Les tests feuilles ont été conduits pour chaque souche de *Phytophthora* par un dispositif expérimental randomisé split-plot à 4 facteurs. Les comparaisons multiples ont été réalisées selon la méthode de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité $p \leq 0,05$.

TROISIÈME PARTIE :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 7 : Isolement et sélection des bactéries endophytes du cacaoyer ayant des propriétés d'intérêt agronomique

7-1-Résultats

7-1-1- Bactéries endophytes isolées

Des bactéries endophytes ont été isolées à partir des organes (racines, tiges et feuilles) de cacaoyer (Figure 20). Les jeunes plants élevés sur des sols de différentes provenances ont tous révélé la présence de bactéries endophytes dans les tissus de leurs organes végétatifs stérilisés en surface. En effet, les densités bactériennes étaient variables de $7,46 \times 10^3$ à 36×10^3 UFC / g pour les racines fraîches et de $0,3 \times 10^3$ à $4,8 \times 10^3$ UFC / g pour les feuilles fraîches (Tableau IV).

Au total, deux cent dix-huit (218) bactéries endophytes ont été obtenues après purification sur la gélose YEM pauvre en azote (Annexe 5). Les isolats retenus ont été purifiés par répiquage successifs sur le même milieu pour s'assurer de leur capacité à fixer l'azote moléculaire (Figure 21). La purification a été ensuite confirmée par une coloration de Gram. La collection obtenue a été isolée à partir des organes (racines, tiges et feuilles) des trois variétés de cacaoyer NA32, P7 et tout-venant. En effet, cinquante-trois (53) isolats bactériens soit 24,31 % ont été isolés de la variété NA32. Soixante-cinq (66) isolats bactériens soit 30,28 % ont été isolés de la variété P7 et quatre-vingt-dix-neuf (99) isolats bactériens soit 45,41 % qui ont été isolés de la variété tout-venant.

Aussi, sur l'ensemble de la collection 152 isolats soit 69,72 % ; 30 isolats soit 13,76 % et 36 isolats soit 16,51 % proviennent respectivement des racines, tiges et feuilles de ces variétés.

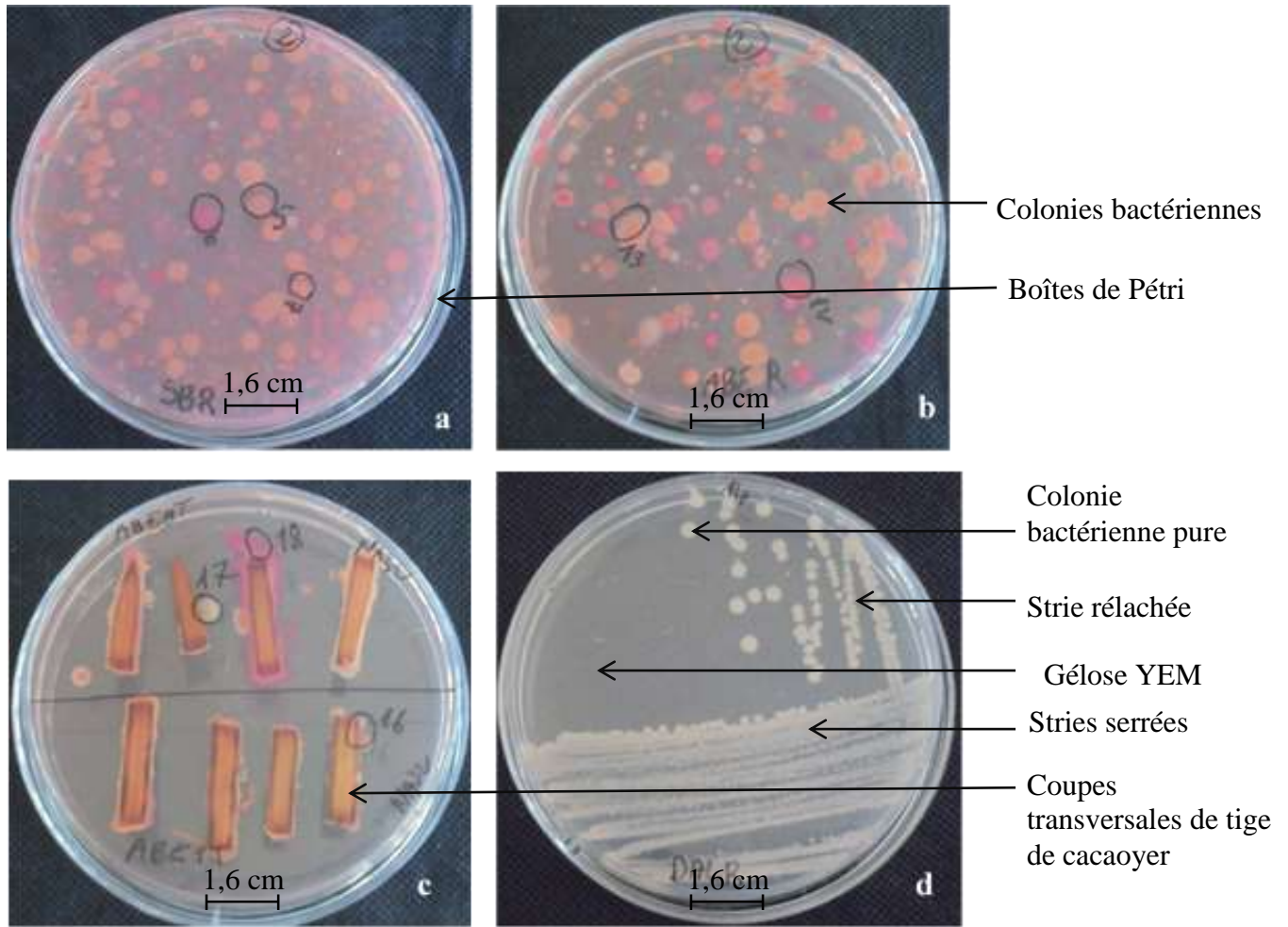


Figure 20 : Colonies de bactéries endophytes isolées à partir des oraganes de cacaoyers

(a et b)- Etalement des broyats de racines ou de feuilles sur le PCA ; (c)- Etalement des coupes transversales des tiges de cacapyers sur le milieu PCA ; d)- Purification des colonies bactériennes par des stries d'épuisement sur le milieu PCA

(Photos : Ouattara Adama, 2018)

Tableau IV : Nombre de bactéries endophytes obtenu selon les organes, les variétés et les localités

Localités	Variétés	Organes	Densité bactérienne ufc/g d'organe frais sur milieu PCA	Nombre d'isolats purifiés sur milieu YEM	Taux d'isolement (%)
Aboisso	P7	Racines	$24,9 \times 10^3$	7	10,09
		Feuilles	$4,5 \times 10^3$	-	
		Tiges	-	2	
	NA32	Racines	$23,5 \times 10^3$	12	
		Feuilles	$4,0 \times 10^3$	-	
		Tiges	-	1	
Abengourou	P7	Racines	$28,7 \times 10^3$	5	7,8
		Feuilles	$3,5 \times 10^3$	1	
		Tiges	-	2	
	NA32	Racines	$14,4 \times 10^3$	6	
		Feuilles	$3,8 \times 10^3$	-	
		Tiges	-	3	
Daloa	P7	Racines	$27,3 \times 10^3$	3	47,25
		Feuilles	$4,8 \times 10^3$	1	
		Tiges	-	-	
	NA32	Racines	$24,7 \times 10^3$	-	
		Feuilles	$3,1 \times 10^3$	-	
		Tiges	-	-	
Tout-venant	Racines	$35,0 \times 10^3$	65		
	Feuilles	$3,6 \times 10^3$	26		
	Tiges	-	8		
Divo	P7	Racines	$20,4 \times 10^3$	7	9,17
		Feuilles	$4,5 \times 10^3$	1	
		Tiges	-	2	
	NA32	Racines	$7,46 \times 10^3$	8	
		Feuilles	$0,43 \times 10^3$	-	
		Tiges	-	2	
Duékoué	P7	Racines	$28,4 \times 10^3$	9	11,93
		Feuilles	$4,6 \times 10^3$	2	
		Tiges	-	4	
	NA32	Racines	$27,3 \times 10^3$	11	
		Feuilles	$3,3 \times 10^3$	-	
		Tiges	-	-	
Soubré	P7	Racines	$27,3 \times 10^3$	10	13,76
		Feuilles	$0,3 \times 10^3$	5	
		Tiges	-	5	
	NA32	Racines	$36,0 \times 10^3$	10	
		Feuilles	$3,1 \times 10^3$	-	
		Tiges	-	-	
Total				218	100

UFC= unité formant colonie

7-1-2- Caractères morphologiques des isolats bactériens au microscope optique

L'observation des colonies au microscope optique a permis de révéler qu'aucune colonie ne présentait un aspect mycélien. Ces colonies étaient constituées de bacilles avec deux modes de regroupement : soit des chaînettes en amas, soit isolé (Figure 21). Par ailleurs, la coloration de Gram des isolats collectés a révélé 191 bacilles (87,61 %) à Gram positif (BG⁺) et 27 bacilles (12,38 %) à Gram négatif ou BG⁻ (Tableau IV). Cette coloration indique la morphologie et le mode de regroupement de chaque isolat (Figure 22).

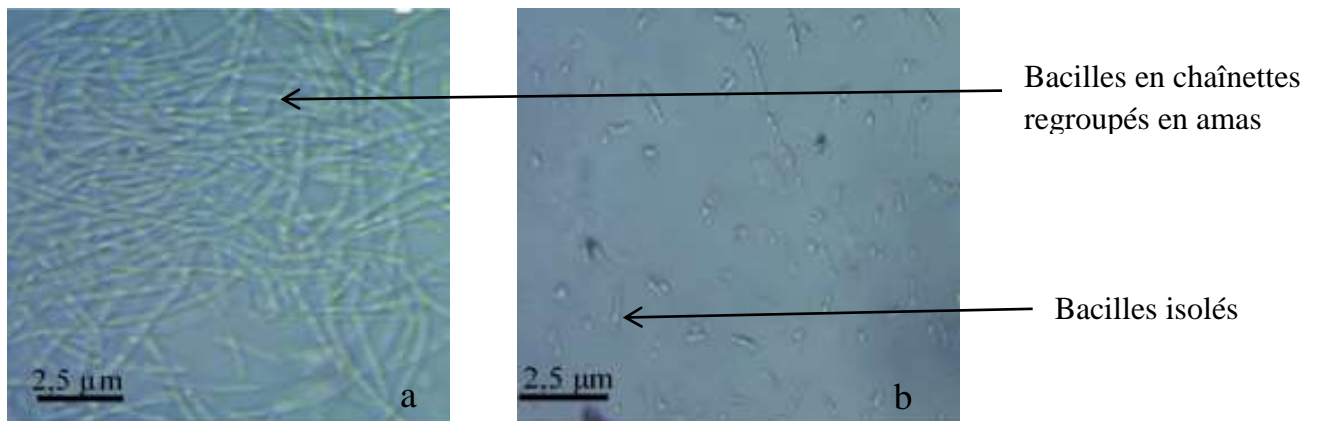


Figure 21 : Aspect des colonies bactériennes au microscope (Grossissement X 400)

(a) Isolat 19P ; (b) Isolat 32P

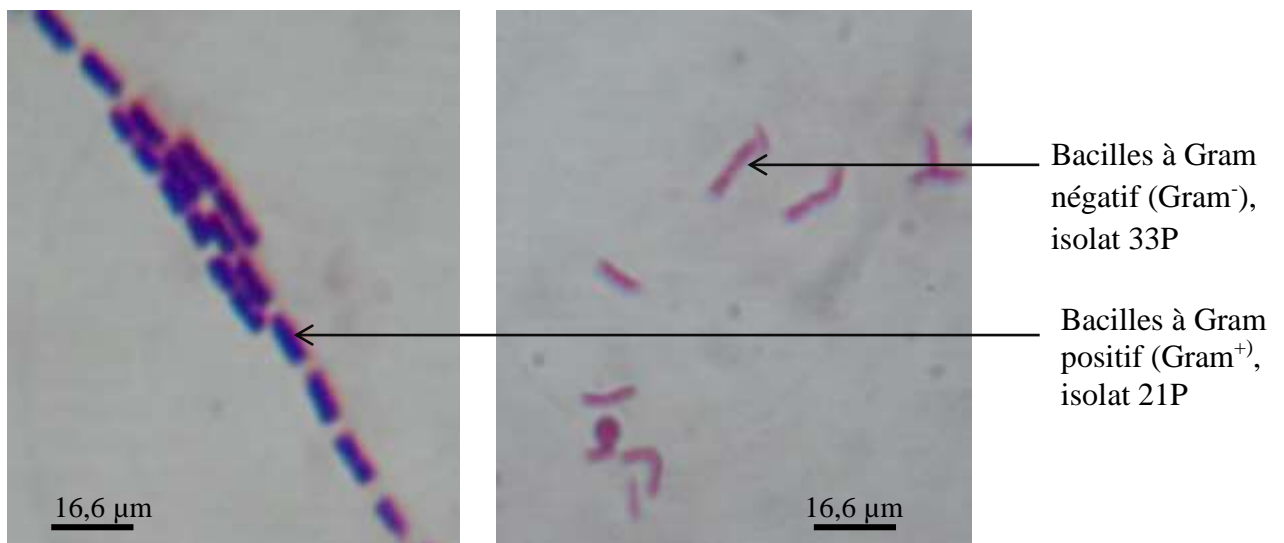


Figure 22 : Morphologie et mode de regroupement des souches révélés par coloration de Gram (GX1000)

(Photos : Ouattara Adama, 2018)

7-1-3- Bactéries endophytes d'intérêt agricole sélectionnées

La sélection des isolats bactériens d'intérêt agricole a été faite sur la base de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (N₂), à solubiliser le phosphate tricalcique, le mica et à produire les enzymes amylase et nitrate réductase.

7-1-3-1- Fixation biologique de l'azote atmosphérique

Deux cent dix-huit (218) bactéries endophytes du cacaoyer isolées sur le milieu de culture PCA, ont pu croître sur la gélose YEM (Yeast extract mannitol agar). Ces isolats ont été capables de fixer l'azote biologique (N₂).

7-1-3-2- Solubilisation du phosphate tricalcique (Ca₃(PO₄)₂)

Au total, 90 isolats sur 218 (41,28 %) de la collection ont pu solubiliser le phosphate tricalcique dans le milieu de culture PVK. Ces isolats ont présenté un halo de solubilisation du phosphate tricalcique sur le milieu de culture PVK (Figure 23). Sept (7) isolats bactériens ont eu les indices de solubilisation les plus élevés compris entre 150 et 200 %. Parmi ces isolats, cinq (38P, 39P, 40P, 41P et 53N) proviennent de plants de cacaoyer cultivés sur des sols de la localité de Duékoué et deux (4P et 5P) proviennent des sols de la localité de Soubré. Le tableau V donne l'exemple de calcul des indices de solubilisation de 45 isolats bactériens ayant eu un indice de solubilisation supérieur ou égal à 70 %.

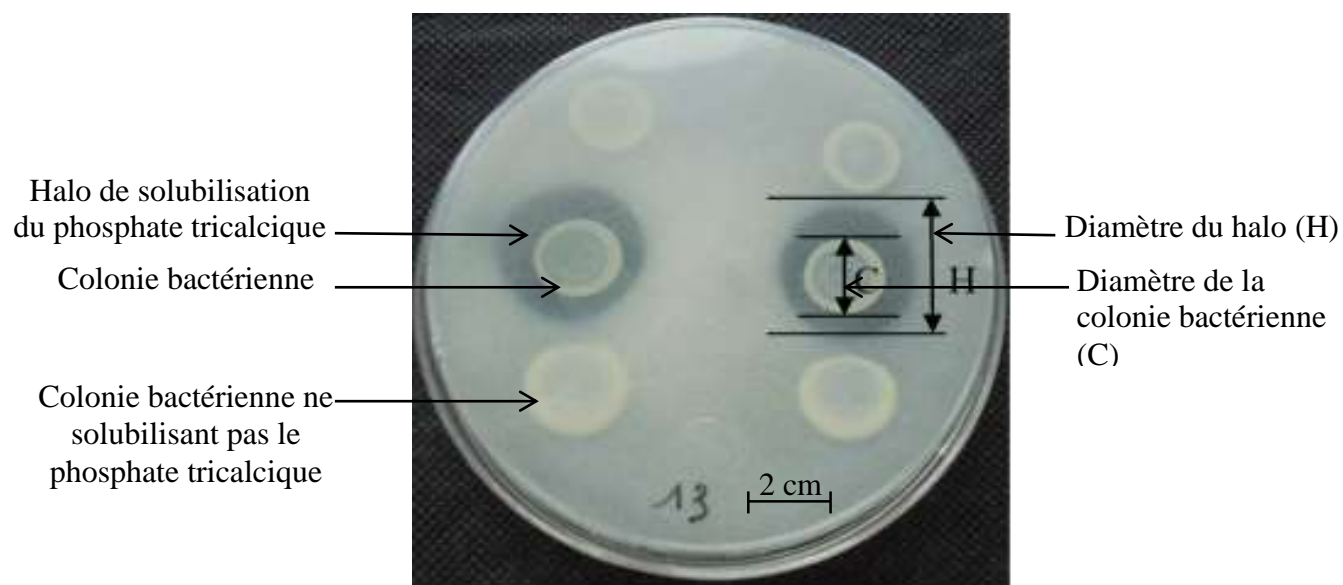


Figure 23 : Solubilisation du phosphate tricalcique sur milieu Pikovkaya (PVK).

(Photo : Ouattara Adama, 2019)

Tableau V : Indices de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction des bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Provenances			Diamètre colonie (mm)	Diamètre halo (mm)	ISP (%)
	Origines	Organes	Variétés			
19P	Aboisso	Racine	P7	7	14	75
22P	Aboisso	Racine	P7	8	14	75
24P	Aboisso	Tige	P7	8	14	75
30P	Duékoué	Racine	P7	10	18	80
37N	Aboisso	Racine	NA32	11	20	81,82
41N	Aboisso	Racine	NA32	12	22	83,33
1P	Soubéré	Racine	P7	7	13	85,71
7P	Divo	Racine	P7	7	13	85,71
11P	Divo	Racine	P7	7	13	85,71
16P	Divo	Feuille	P7	7	13	85,71
29P	Duékoué	Racine	P7	7	13	85,71
55P	Soubéré	Racine	P7	7	13	85,71
56P	Soubéré	Feuille	P7	7	13	85,71
61P	Abengourou	Feuille	P7	8	15	87,5
35P	Duékoué	Racine	P7	8	15	87,5
36P	Aboisso	Racine	P7	8	15	87,5
3N	Soubéré	Racine	NA32	8	15	87,5
46P	Soubéré	Tige	P7	8	15	87,5
18P	Aboisso	Racine	P7	8	15	87,5
35N	Aboisso	Racine	NA32	11	21	90,91
2P	Soubéré	Racine	P7	13	25	92,31
1N	Soubéré	Racine	NA32	15	29	93,33
6P	Soubéré	Tige	P7	7	14	100
20P	Aboisso	Racine	P7	7	14	100
21P	Aboisso	Racine	P7	7	14	100
25P	Aboisso	Racine	P7	6	12	100
32P	Duékoué	Tige	P7	7	14	100
33P	Duékoué	Racine	P7	7	14	100
39P	Duékoué	Racine	P7	8	16	100
47P	Soubéré	Tige	P7	6	12	100
58P	Abengourou	Tige	P7	8	16	100
31N	Aboisso	Racine	NA32	7	17	100
33N	Aboisso	Racine	NA32	8	18	100
3P	Soubéré	Feuille	P7	7	15	114,29
8P	Divo	Tige	P7	7	15	114,29
31P	Duékoué	Racine	P7	7	15	114,29
34P	Duékoué	Racine	P7	7	16	128,57
4P	Soubéré	Feuille	P7	7	17	142,86
37P	Duékoué	Tige	P7	6	15	150
38P	Duékoué	Racine	P7	6	15	150
42P	Soubéré	Feuille	P7	6	15	150
5P	Soubéré	Tige	P7	5	13	160
40P	Duékoué	Feuille	P7	7	20	185,71
53N	Duékoué	Tige	NA32	11	32	191
41P	Duékoué	Tige	P7	6	18	200

ISP = indice de solubilisation du phosphate tricalcique exprimé en (%)

Au niveau des localités, les indices moyens de solubilisation observés ont été de $137,67 \pm 5,58$; $86 \pm 4,68$; $67,67 \pm 5,64$; $54,67 \pm 5,90$; $45 \pm 4,92$ % et $40,13 \pm 4,77$ % respectivement pour les isolats bactériens provenant de Duékoué, Soubré, Aboisso, Daloa, Divo et Abengourou (Figure 24).

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré une différence significative ($p < 0,001$) entre les indices moyens de solubilisation des bactéries endophytes provenant des plants de cacaoyers cultivés sur les sols des six régions (Figure 24). Par ailleurs, le test de comparaison multiple de Student-Newmann-Keuls a révélé cinq groupes homogènes (a, b, c, cd, d) d'isolats bactériens selon les indices moyens ajustés de solubilisation (Figure 25). La plus petite différence significative entre ces différents indices a été de 22,67 %.

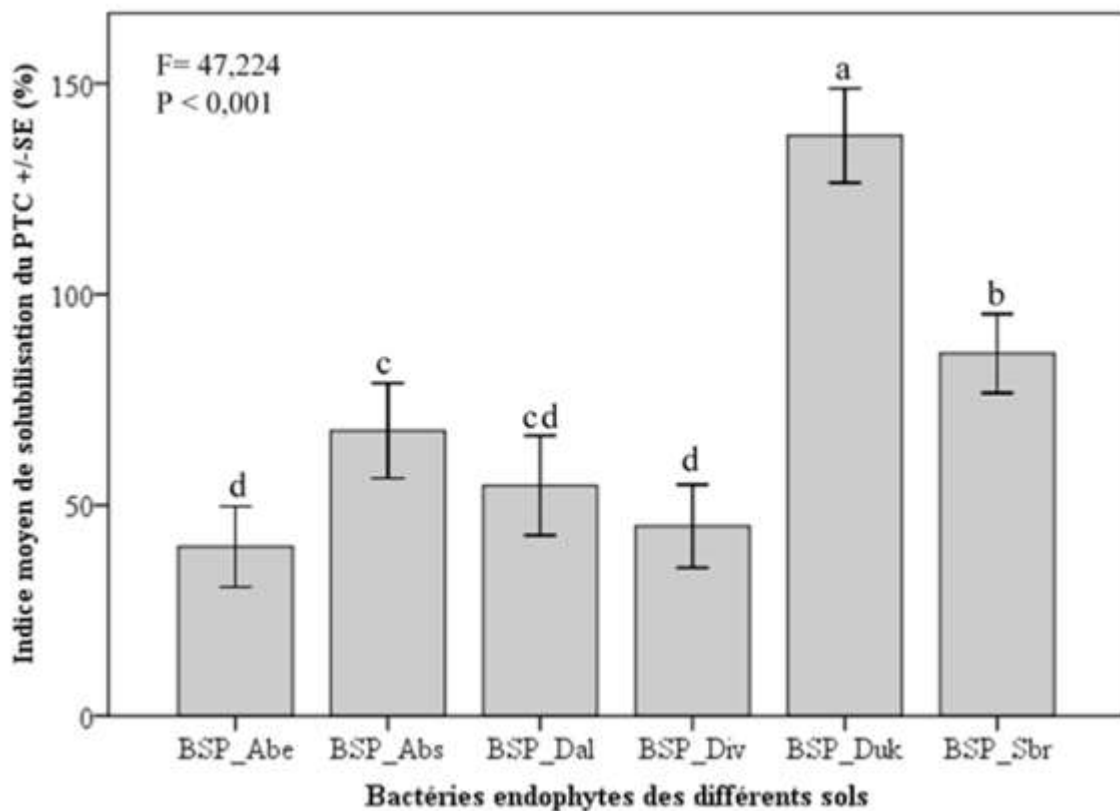


Figure 24: Indices moyens ajustés de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction de la provenance des sols

BSP (bactéries solubilisant le phosphate tricalcique) ; Abe (Abengourou) ; Abs (Aboisso) ; Dal (Daloa) ; Div (Divo) ; Duk (Duékoué) et Sbr (Soubré). PTC= Phosphate tricalcique. SE= Erreur Standard. Les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents selon le test de Student-Newmann-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Les bactéries isolées à partir de plants de cacaoyer cultivés sur les sols de Duékoué suivie de ceux des sols de Soubré ont été les plus efficaces. Ces isolats bactériens ont présenté les indices de solubilisation du phosphate tricalcique les plus élevés allant de 100 à 200 %, avec des indices moyens respectifs de $137,67 \pm 5,58$ et $86 \pm 4,68$ %. Les indices de solubilisation les plus faibles ont été observés chez les bactéries provenant des sols de Divo et d'Abengourou.

Le test de Student-Newman-Keuls a montré une différence significative ($p < 0,001$) entre les indices moyens des bactéries isolées des sols de Duékoué et ceux de Soubré, Aboisso, Daloa Abengourou et Divo.

Selon la variété des plants de cacaoyers, les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ont été de $79,14 \pm 5,58$; $71,92 \pm 7,33$ et de $54,67 \pm 5,90$ % respectivement pour les isolats bactériens provenant des variétés NA32, P7 et tout-venant. Au niveau des organes les indices moyens de solubilisation observés ont été $77,16 \pm 6,45$; $74,60 \pm 7,11$ et $63,80 \pm 7,60$ % respectivement pour les isolats bactériens provenant des racines, des tiges et des feuilles.

La comparaison des isolats bactériens selon le test non-paramétrique de Mood n'a révélé aucune différence significative ($p = 0,0985$) entre les médianes des indices de solubilisation du phosphate tricalcique des endophytes bactériens, selon leur provenance des trois variétés de cacaoyer (P7, NA32 et tout-venant) (Figure 25 A). De même aucune différence de signification ($p = 0,4685$) n'a été observé entre les médianes des indices de solubilisation des populations bactériennes prises selon leur provenance des différents organes (racines, tiges et feuilles) (Figure 25 B).

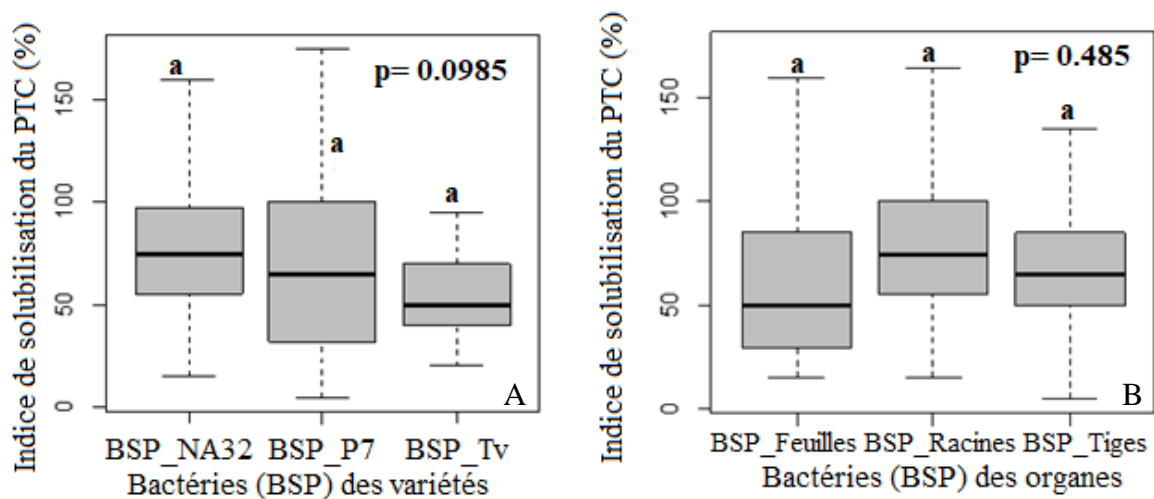


Figure 25 : Indices de solubilisation du phosphate tricalcique des bactéries endophytes du cacaoyer en fonction de leurs provenances

(A) Bactéries provenant des variétés et (B) Bactéries provenant des organes.

Les médianes surmontées des mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes selon le test non paramétrique de Mood au seuil de probabilité 5 %.

7-1-3-3- Solubilisation du potassium (mica)

Les bactéries qui ont solubilisé le mica ont été caractérisées par l'apparition d'un halo blanchâtre ou rosâtre autour de la colonie bactérienne sur le milieu Aleksandrov modifié solide après 7 jours d'incubation à 28 ± 2 °C (Figure 26). Au total, 189 (89,26 %) isolats ont été capables de solubiliser le mica. Les indices de solubilisation ont varié de 70 à 300 % (Tableau VI). Les indices moyens de solubilisation du mica ont été de $148 \pm 6,79$; $107,00 \pm 7,36$; $99,67 \pm 6,91$; $63,00 \pm 6,79$; $61,33 \pm 7,11$ et de $51,33 \pm 7,11$ % respectivement pour les isolats provenant de Daloa, Soubré, Duékoué, Divo, Aboisso et Abengourou.

Au niveau des variétés de cacaoyers, les indices moyens de solubilisation du mica ont été de $148,00 \pm 6,79$; $87,62 \pm 4,02$ et $66,70 \pm 3,32$ % respectivement pour les isolats bactériens provenant des plants issues des variétés tout-venant, NA32 et P7.

Au niveau des organes, les indices moyens de solubilisation ont été de $100,63 \pm 6,50$; $90,93 \pm 7,91$ et $73,60 \pm 8,36$ % respectivement pour les isolats bactériens provenant des racines, des tiges et des feuilles.

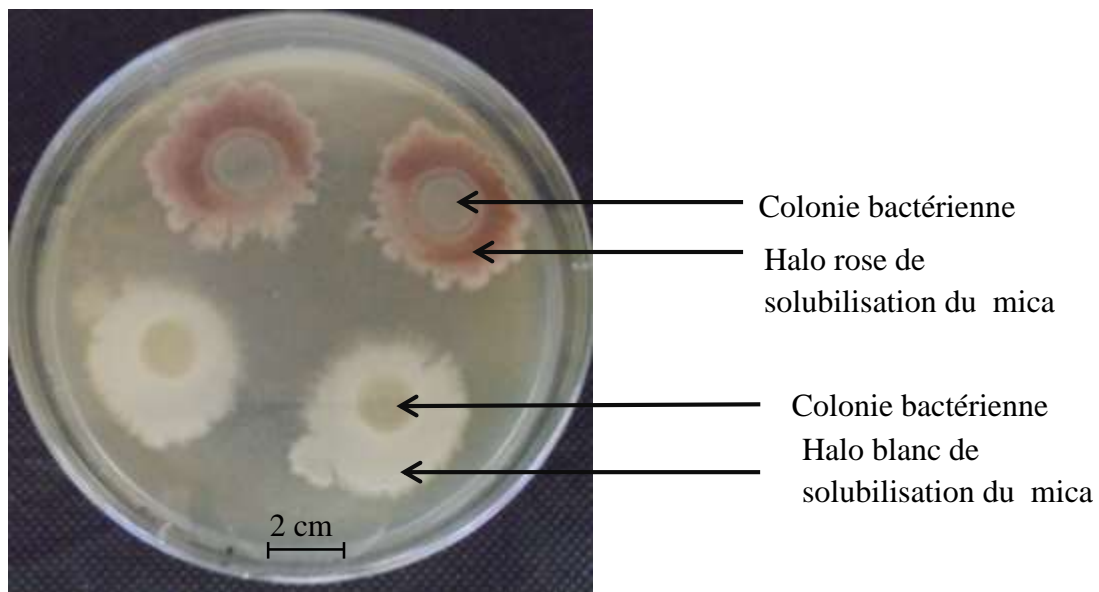


Figure 26 : Solubilisation du mica sur milieu Aleksandrov modifié

(Photo : Ouattara Adama, 2019)

Tableau VI : Indices de solubilisation du potassium (mica) en fonction des bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Provenances			Diamètre colonie (mm)	Diamètre halo (mm)	ISK (%)
	Origines	Organes	Variétés			
8P	Divo	Tige	P7	7	14	100,00
26P	Duékoué	Racine	P7	7	14	100,00
11P	Divo	Racine	P7	11	23	109,09
43N	Aboisso	Racine	NA32	0,8	1,7	112,50
55P	Abengourou	Racine	P7	14	30	114,29
47P	Soubré	Feuille	P7	11	24	118,18
63P	Daloa	Racine	P7	5	11	120,00
17P	Aboisso	Racine	P7	10	22	120,00
30P	Duékoué	Tige	P7	9	20	122,22
41P	Soubré	Racine	P7	9	20	122,22
37P	Duékoué	Feuille	P7	8	18	125,00
40P	Soubré	Racine	P7	11	25	127,27
56P	Abengourou	Racine	P7	7	16	128,57
50P	Soubré	Racine	P7	10	23	130,00
46P	Soubré	Racine	P7	6	14	133,33
9P	Divo	Racine	P7	10	24	140,00
21N	Divo	Racine	NA32	0,5	1,2	140,00
7P	Divo	Racine	P7	7	17	142,86
16P	Divo	Racine	P7	8	20	150,00
22P	Aboisso	Tige	P7	4	10	150,00
27P	Duékoué	Feuille	P7	6	15	150,00
38P	Duékoué	Tige	P7	8	20	150,00
31P	Duékoué	Racine	P7	9	23	155,56
54P	Abengourou	Tige	P7	7	18	157,14
25P	Aboisso	Racine	P7	9	24	166,67
39P	Soubré	Feuille	P7	7	20	185,71
2P	Soubré	Racine	P7	0,7	2	185,71
53P	Duékoué	Tige	P7	8	23	187,50
1P	Soubré	Racine	P7	1,2	3,5	191,67
BEC122	Daloa	Racine	TV	10	30	200,00
BEC125	Daloa	Feuille	TV	10	30	200,00
BEC145	Daloa	Racine	TV	10	30	200,00
BEC155	Daloa	Racine	TV	10	30	200,00
BEC157	Daloa	Racine	TV	11	31	200,00
BEC163	Daloa	Racine	TV	10	30	200,00
BEC123	Daloa	Racine	TV	11	35	218,00
BEC154	Daloa	Racine	TV	11	35	218,00
BEC132	Daloa	Racine	TV	10	32	220,00
BEC162	Daloa	Racine	TV	9	29	222,00
3P	Soubré	Feuille	P7	0,7	2,4	242,86
BEC114	Daloa	Feuille	TV	9	35	289,00
BEC115	Daloa	Feuille	TV	10	36	260,00
4P	Soubré	Feuille	P7	0,7	2,3	266,67
BEC142	Daloa	Racine	TV	11	41	273,00
BEC146	Daloa	Racine	TV	10	40	300,00

ISK= indice de solubilisation du mica (potassium) exprimé en (%)

L'analyse de la variance a montré une différence significative entre les indices moyens de solubilisation du mica selon la localité, selon la variété de cacaoyer et selon le type d'organes dont proviennent les isolats bactériens. Au niveau des localités la plus petite différence significative a été de 36,67 %. Au niveau des variétés et des organes, la plus petite différence significative a été respectivement de 20,92 % et de 27,03 %. Par ailleurs, le test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls a révélé trois groupes homogènes (a, b, c) de populations bactériennes parmi les six localités de provenances (Figure 27), trois groupes homogènes (a, b, c) selon leur provenance des variétés (Figure 28 A) et trois groupes homogènes (a, ab, b) selon l'organe dont proviennent les populations bactériennes (Figure 28 B).

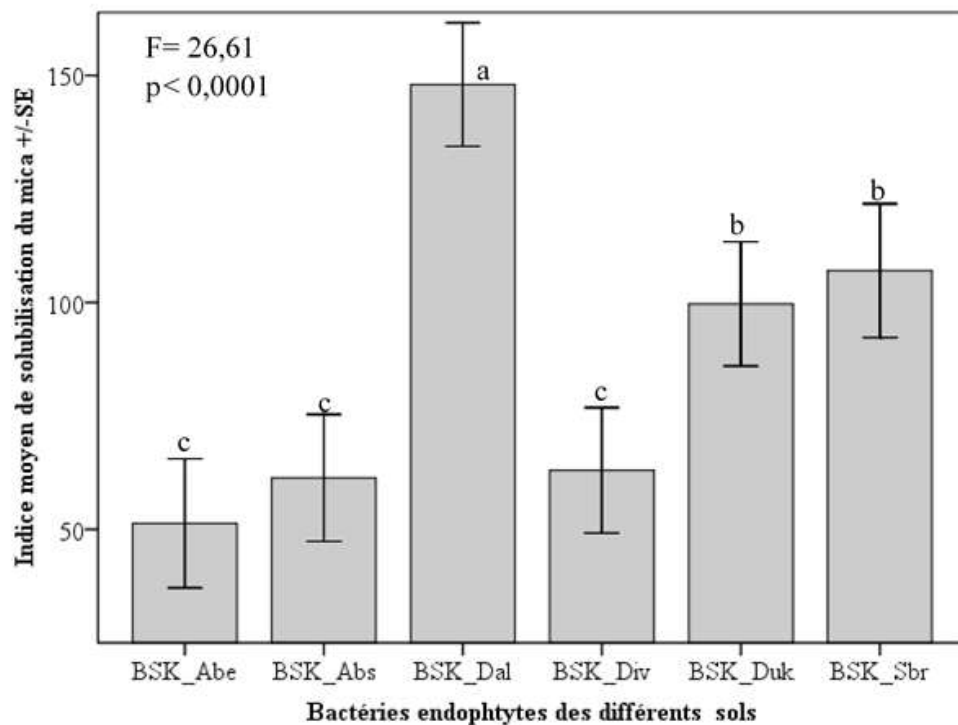


Figure 27 : Indices de solubilisation du mica (potassium) par les bactéries endophytes du cacaoyer en fonction de la provenance du sol.

BSK (bactéries solubilisant le potassium) ; Abe (Abengourou) ; Abs (Aboisso) ; Dal (Daloa) ; Div (Divo) ; Dué (Duékoué) et Sbr (Soubré). Les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

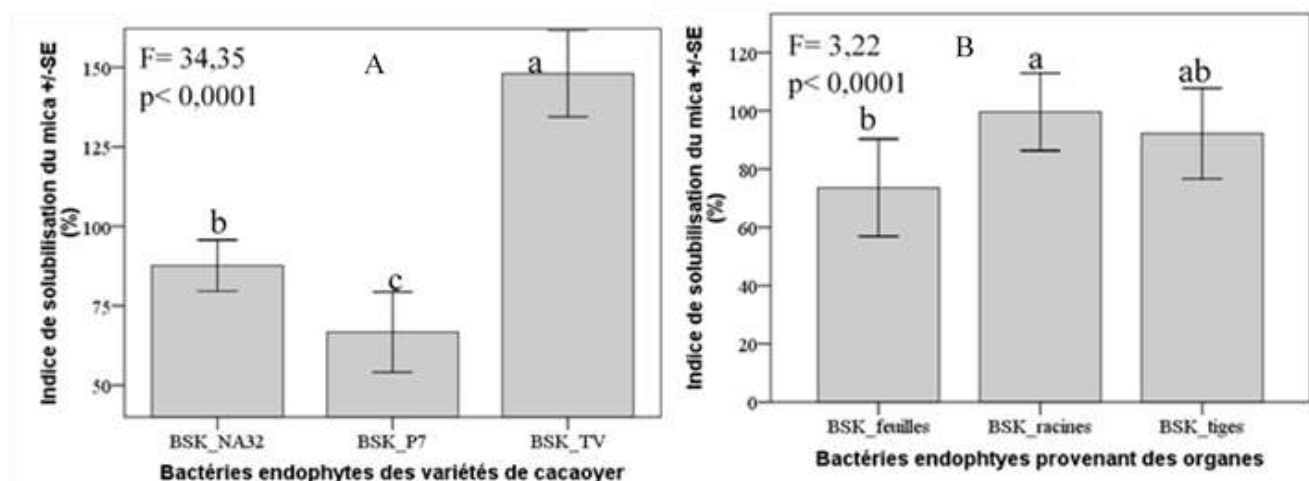


Figure 28 : Indices de solubilisation du mica par les bactéries endophytes du cacaoyer en fonction de leurs provenances

(A) Bactéries endophyte solubilisant le mica (BSK) isolées des différentes variétés de cacaoyers ; (B) Bactéries endophyte solubilisant le mica (BSK) isolées des différents organes de cacaoyers.

Les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

En effet, les endophytes bactériens isolés des plants de cacaoyer élevés sur les sols collectés dans la localité de Daloa, ont eu les indices de solubilisation les plus élevés. Leur indice moyen a été de $148 \pm 6,79$ %. Ces isolats ont été suivis de ceux isolés des sols des localités de Soubré et de Duékoué avec des indices moyens respectifs de $107,00 \pm 7,36$ et de $99,67 \pm 6,91$ %. Les isolats issus des sols des localités d'Abengourou, d'Aboisso et de Divo ont eu les indices moyens de solubilisation du mica les plus bas respectivement de 51,33 ; 61,33 et 63,00 %.

Au niveau des variétés, une différence significative ($p < 0,0001$) a été observée entre les indices moyens de solubilisation du mica des populations bactériennes isolées des variétés de cacaoyer NA32, P7 et tout-venant. Les bactéries issues du matériel tout-venant ont eu l'indice moyen le plus élevé 148,00 %. Ces bactéries ont été suivies respectivement de celles isolées des variétés NA32 et P7 avec des indices moyens respectifs de 87,62 et 66,70 %.

Par ailleurs, une différence significative a été observée entre les indices moyens de solubilisation du mica des populations d'isolats bactériens issus des racines et des feuilles des trois variétés de cacaoyer.

7-1-3-4. Production d'amylase

Cette expérience a été réalisée avec les 45 isolats ayant solubilisé le phosphate tricalcique avec un indice de solubilisation supérieur ou égal à 70 %. Les résultats de ce test ont montré que presque tous les isolats bactériens ont été capables d'hydrolyser l'amidon. Cela s'est traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies chez 44 isolats sur 45 soit 97,73 % des isolats (Figures 29). Seul l'isolat (41N) a donné une coloration noire en présence du lugol comme l'indique la Figure 31. Ce qui traduit l'incapacité de cette bactérie à synthétiser l'enzyme amylase. Les isolats ont hydrolysé l'amidon indépendamment de leur provenance. C'est-à-dire aucun effet de leur provenance du sol, de la variété et de l'organe n'a été observé.

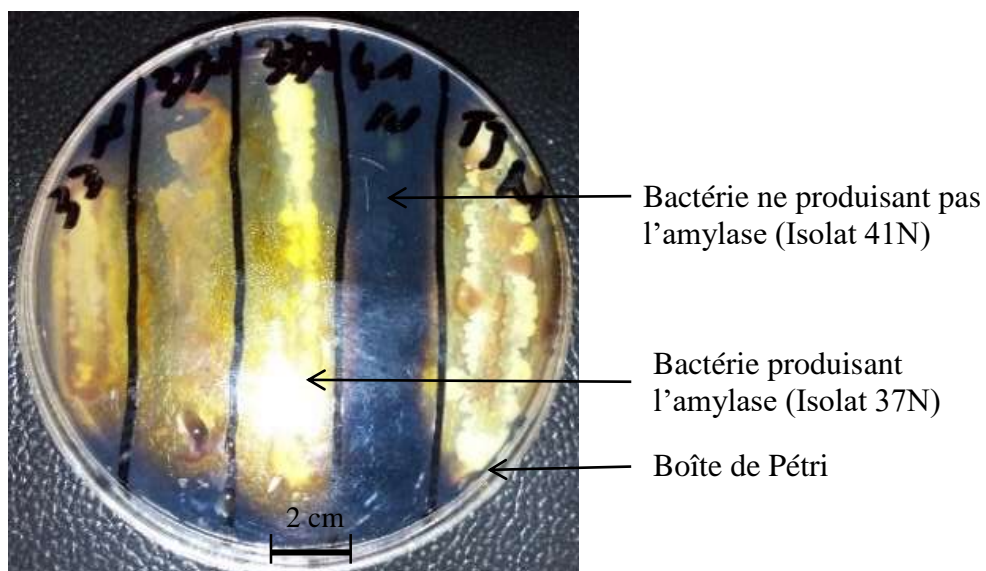


Figure 29 : Mise en évidence de la production d'amylase par les souches bactériennes étudiées

(Photo : Ouattara Adama, 2019)

7-1-3-5. Réduction du nitrate de potassium (KNO_3)

Les isolats bactériens ont toléré le nitrate de potassium jusqu'à la concentration de 4 % (p/v). Cependant, à partir de la concentration de 6 %, la moitié des isolats a été inhibée (Figure 30). Le nombre d'isolats inhibés a aussi augmenté au fur et à mesure que la concentration a augmenté. A la concentration de 10 % (p/v), seulement 12 isolats sur 45 (26,67 %) ont pu tolérer et utiliser le nitrate de potassium (Figure 31). Par ailleurs, la tolérance des isolats bactériens au nitrate de potassium a varié d'un isolat à un autre. Certains isolats tels que 1P, 2P, 18P, 19P ont été totalement inhibés à la concentration de 10 % (p/v), tandis que l'isolat 58P a été très sensible à partir de la concentration de 6 % (p/v). Contrairement à ces isolats cités précédemment, d'autres isolats tels que 3P, 6P, 7P, 8P, 11P, 16P, 18P ont été très tolérants à des concentrations de nitrate de potassium allant de 2 à 10 % (Tableau VII).

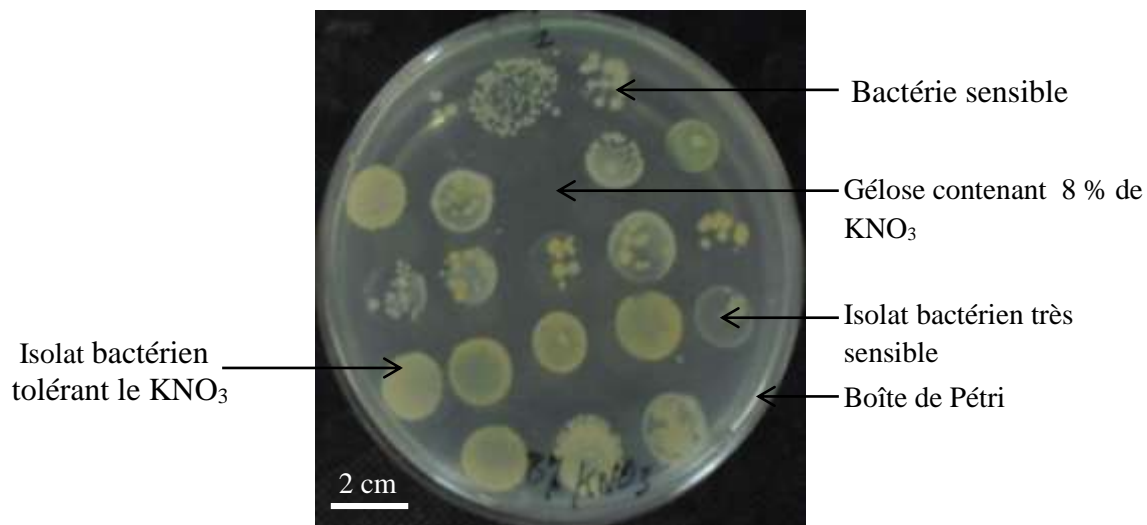


Figure 30 : Effet du nitrate de potassium (KNO_3) sur la survie des bactéries endophytes du cacaoier

(Photo : Ouattara Adama, 2018)

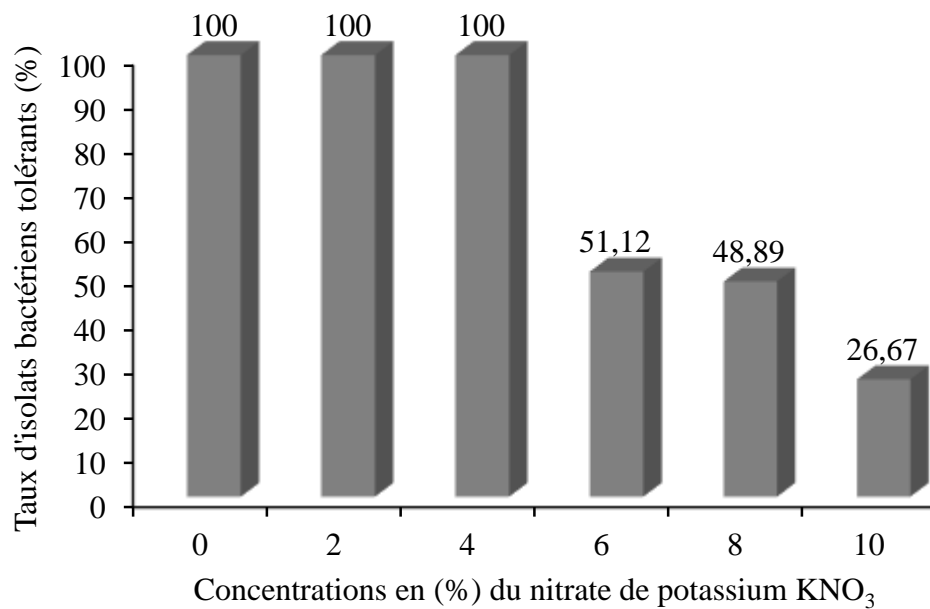


Figure 31 : Taux des isolats bactériens tolérants en fonction de différentes concentrations de nitrate de potassium KNO₃

Tableau VII : Effet du nitrate de potassium (NaNO_2) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Qualité de la croissance bactérienne				
	Concentrations en KNO_3 (%)				
	2	4	6	8	10
1P	+++	++	+	+	-
2P	+++	++	+	+	-
3P	+++	++	++	++	++
4P	+++	+++	++	++	+
5P	+++	++	++	++	+
6P	+++	++	++	++	+
7P	+++	+++	+++	++	++
8P	+++	+++	+++	++	++
11P	+++	+++	+++	++	++
16P	+++	+++	+++	++	++
18P	+++	++	+	++	-
19P	+++	++	++	+	-
20P	+++	++	+	+	+
21P	+++	++	+	+	+
22P	+++	++	+	+	-
24P	+++	++	+	+	+
25P	+++	++	+	+	+
29P	+++	++	+	+	-
30P	+++	++	+	+	+
31P	+++	++	+	+	-
32P	+++	++	+	+	-
33P	+++	++	+	+	-
34P	+++	++	+	+	-
35P	+++	++	+	+	+
36P	+++	++	+	+	-
37P	+++	++	+	+	-
38P	+++	++	++	++	+
39P	+++	++	++	++	+
40P	+++	++	++	++	+
41P	+++	+++	+++	++	++
42P	+++	++	++	+++	-
46P	+++	+++	++	++	++
47P	+++	++	++	++	++
55P	+++	++	++	++	++
56P	+++	+++	++	++	++
58P	+++	++	-	-	-
61P	+++	++	++	++	++
1N	+++	+++	+++	++	+
3N	+++	++	++	++	+
31N	+++	++	+	+	-
33N	+++	++	+	+	-
35N	+++	++	+	+	-
37N	+++	++	+	+	-
41N	+++	++	+++	+	-
53N	+++	+++	+++	+++	++

Bonne croissance (+++), Croissance moyenne (++), Croissance faible (+), Pas de croissance (-)

7-1-3-6- Réduction du nitrite de sodium (NaNO_2)

Le nitrite de sodium a été très toxique pour les endophytes bactériens isolés du cacaoier (Figure 32). En effet, pour une concentration de 0,25 % (*p/v*) seulement 11 isolats bactériens (1P ; 2P ; 3P. 4P ; 7P ; 18P ; 19P ; 24P ; 25P ; 35P ; 61P ; 31N ; 33N ; 35N et 37N) sur 45 soit 24,44 % ont pu tolérer le nitrite de sodium, contre trois isolats (1P ; 4P et 53N) sur 45 soit 6,67 % qui ont toléré le nitrite de sodium à la concentration de 0,5 % (*p/v*). Aucun isolat n'a toléré le nitrite de sodium à la concentration de 0,75 % *p/v* (Tableau VIII).

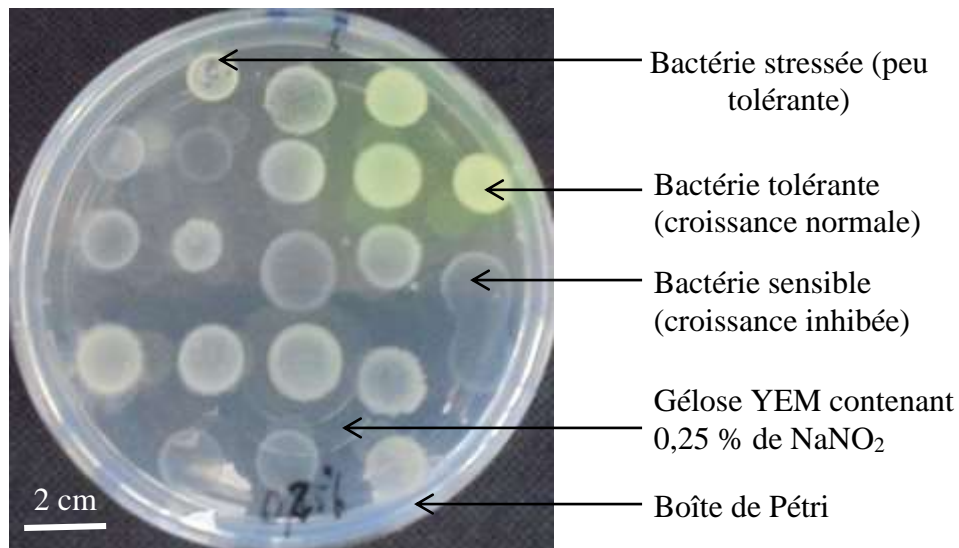


Figure 32 : Effet du nitrite de sodium (NaNO_2) sur la survie des bactéries endophytes du cacaoier

(Photo : Ouattara Adama, 2018)

Tableau VIII : Effet du nitrite de sodium (NaNO₂) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Qualité de la croissance bactérienne		
	Nitrite de sodium (%)		
	0,25	0,5	0,75
1P	+++	++	-
2P	++	+	-
3P	++	+	-
4P	+++	++	-
5P	+	+	-
6P	+	+	-
7P	++	+	-
8P	+	+	-
11P	+	+	-
16P	+	+	-
18P	++	+	-
19P	++	+	-
20P	+	+	-
21P	+	+	-
22P	+	+	-
24P	++	-	-
25P	++	+	-
29P	+	-	-
30P	+	+	-
31P	-	+	-
32P	-	-	-
33P	+	-	-
34P	+	-	-
35P	++	+	-
36P	+	+	-
37P	+	+	-
38P	+	+	-
39P	+	+	-
40P	+	+	-
41P	+	+	-
42P	+	-	-
46P	+	-	-
47P	+	-	-
55P	-	-	-
58P	+	-	-
61P	+++	-	-
1N	-	-	-
3N	-	-	-
31N	++	-	-
33N	+++	+	-
35N	+++	+	-
37N	+++	+	-
41N	+	+	-
53N	++	++	-

Bonne croissance (+++), Croissance moyenne (++), Croissance faible (+), Pas de croissance (-)

7-1-4- Caractérisation physiologique des isolats bactériens d'intérêt agronomique

7-1-4-1- Tolérance des bactéries endophytes du cacaoyer à la salinité (NaCl)

Tous les isolats bactériens ont toléré le NaCl à des concentrations allant de 1 à 4% (*p/v*). A la concentration de 4 % (*p/v*), 62,23 % des isolats ont montré une bonne croissance. Au-delà de la concentration de 4 % (*p/v*), le nombre d'isolats tolérant le NaCl a baissé drastiquement à 9 isolats sur 45 soit (20 %) et à 4 isolats sur 45 soit (8,89 %) pour des concentrations respectives de 6 et 10 % (*p/v*) de NaCl (Figure 33). Certains isolats tels que 30P, 31P, 33P et 37N ont été très sensibles et ont été totalement inhibés à partir de la concentration de 6 % de NaCl (Figure 34). Par contre, d'autres isolats tels que 46P, 47P, 58P, 61P et 1N ont exhibé une bonne tolérance à la salinité jusqu'à la concentration de 10 % (*p/v*) de NaCl (Tableau IX).

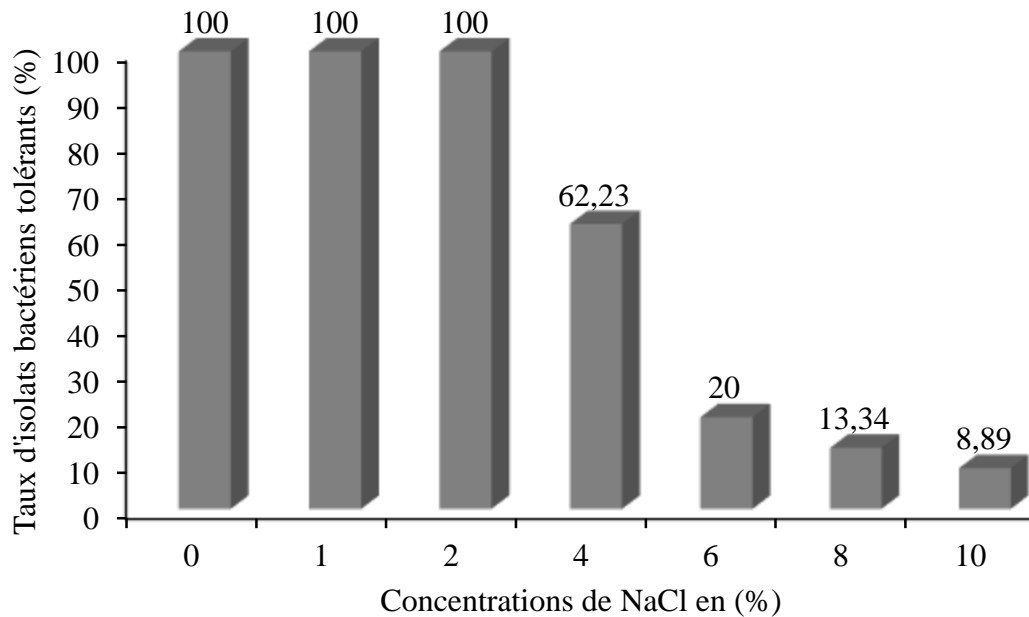
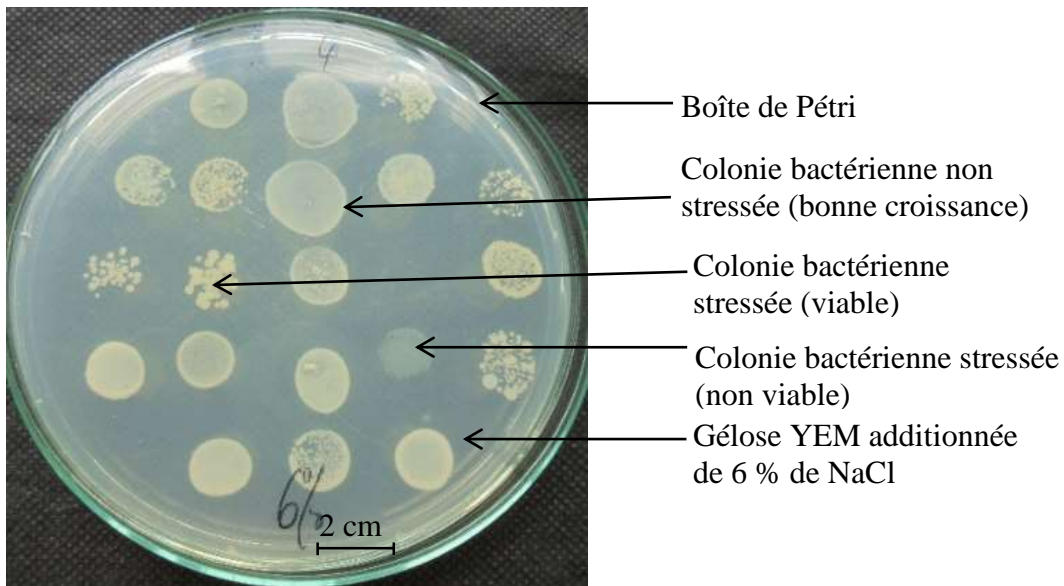
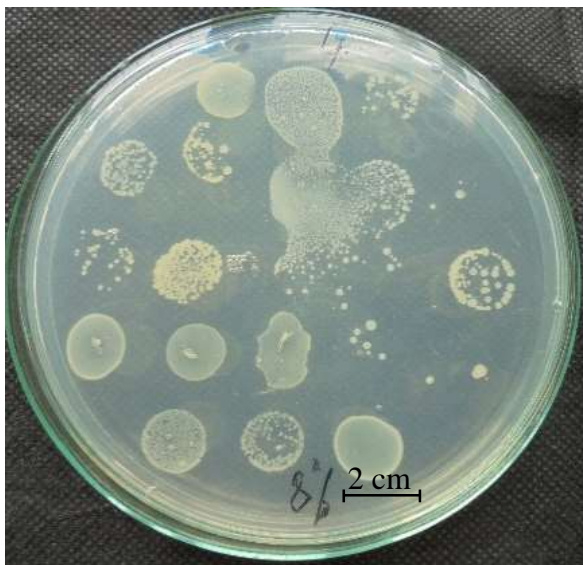


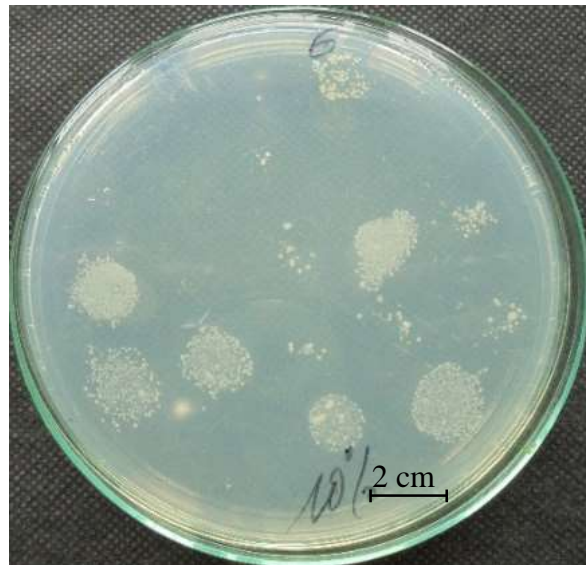
Figure 33 : Taux d'isolats bactériens tolérants en fonction de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl)



a- Croissance des isolats bactériens à la concentration de 6 % de NaCl



b- Croissance des isolats bactériens à la concentration de 8 % de NaCl



c- Croissance des isolats bactériens à la concentration de 10 % de NaCl

Figure 34 : Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la survie des bactéries endophytes du cacaoyer

(Photos : Ouattara Adama, 2018)

Tableau IX : Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Qualité de la croissance bactérienne						
	Concentration de chlorure de sodium NaCl (%)						
	0	1	2	4	6	8	10
1P	+++	++	++	+	+	-	-
2P	+++	++	++	+	+	+	-
3P	+++	++	++	+	+	-	-
4P	+++	++	++	+	+	-	-
5P	+++	++	++	+	+	-	-
6P	+++	++	++	+	+	+	-
7P	+++	++	++	+	+	+	-
8P	+++	++	++	+	+	+	-
11P	+++	++	++	+	+	-	-
16P	+++	++	++	+	+	+	-
18P	+++	++	++	+	+	+	-
19P	+++	++	++	+	+	+	-
20P	+++	++	++	++	++	+	-
21P	+++	++	++	++	++	++	-
22P	+++	++	++	+	+	+	-
24P	+++	++	++	++	++	+	-
25P	+++	++	++	++	+	+	-
29P	+++	++	++	++	++	++	-
30P	+++	++	++	++	-	-	-
31P	+++	++	++	++	-	-	-
32P	+++	++	++	++	+	+	-
33P	+++	++	++	++	-	-	-
34P	+++	++	++	++	++	+	-
35P	+++	++	++	++	+	-	-
36P	+++	++	++	++	+	-	-
37P	+++	++	++	++	+	+	-
38P	+++	++	++	++	+	+	-
39P	+++	++	++	++	+	+	-
40P	+++	++	++	++	+	+	-
41P	+++	++	++	++	+	+	-
42P	+++	++	++	++	+	+	-
46P	+++	++	++	++	++	++	++
47P	+++	++	++	++	++	++	++
55P	+++	++	++	++	+	+	-
56P	+++	++	++	++	+	+	-
58P	+++	++	++	++	+	+	+
61P	+++	++	++	++	++	++	++
1N	+++	++	++	++	++	++	++
3N	+++	++	++	+	+	+	-
31N	+++	++	++	+	+	-	-
33N	+++	++	++	++	+	-	-
35N	+++	++	++	+	+	+	-
37N	+++	++	++	+	-	-	-
41N	+++	++	++	++	+	-	-
53N	+++	++	++	++	+	-	-

Bonne croissance (+++), Croissance moyenne (++), Croissance faible (+), Pas de croissance (-)

7-1-4-2- Tolérance des isolats à l'urée

La majorité des bactéries endophytes isolées du cacaoyer ont été très sensibles à l'urée. En effet, seulement cinq isolats (31N, 33N, 35N, 37N et 41N) sur 45 soit 11,11 % ont toléré l'urée à une concentration de 2 % (*p/v*). Aucun isolat n'a toléré l'urée à des concentrations de 4 et 6 % (*p/v*) (Tableau X).

Tableau X : Effet de l'urée sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Qualité de la croissance bactérienne		
	Concentration de l'urée (%)		
	2	4	6
1P	+	-	-
2P	+	-	-
3P	+	-	-
4P	+	-	-
5P	+	-	-
6P	+	-	-
7P	+	-	-
8P	+	-	-
11P	+	-	-
16P	+	-	-
18P	+	-	-
19P	+	-	-
20P	+	-	-
21P	+	-	-
22P	+	-	-
24P	+	-	-
25P	+	-	-
25P	+	-	-
29P	+	-	-
30P	+	-	-
31P	+	-	-
32P	+	-	-
33P	+	-	-
34P	+	-	-
35P	+	-	-
36P	+	-	-
37P	+	-	-
38P	+	-	-
39P	+	-	-
40P	+	-	-
41P	+	-	-
42P	+	-	-
46P	+	-	-
47P	+	-	-
55P	+	-	-
58P	+	-	-
61P	+	-	-
1N	+	-	-
3N	+	-	-
31N	++	-	-
33N	++	-	-
35N	++	-	-
37N	++	-	-
41N	++	-	-
53N	+	-	-

Bonne croissance (+++), Croissance moyenne (++) , Croissance faible (+), Pas de croissance (-)

7-1-4-3- Tolérance des isolats à l'engrais chimique NPK (0-23-19)

Les 45 bactéries endophytes du cacaoyer testées, ont toléré l'engrais NPK à des concentrations allant de 2 à 8 % *p/v* (Figure 35). Cependant, à la concentration de 10 % (*p/v*), seuls 15 isolats sur 45 (soit 33,34 %) ont toléré le NPK (Figure 36). Cinq (5) isolats (1N, 3N, 35N, 37N et 53N) ont exhibé une très forte tolérance à la concentration 10 % (*p/v*) de NPK (Tableau XI).

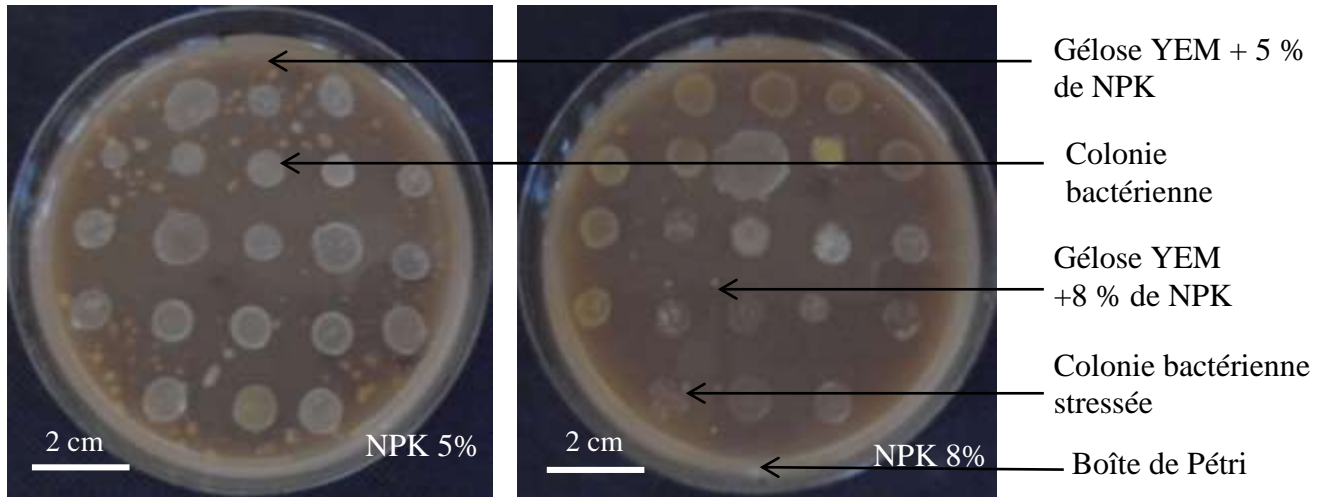


Figure 35 : Effet de l'engrais NPK sur la croissance et la survie des bactéries endophytes du cacaoyer

(Photos : Ouattara Adama, 2018)

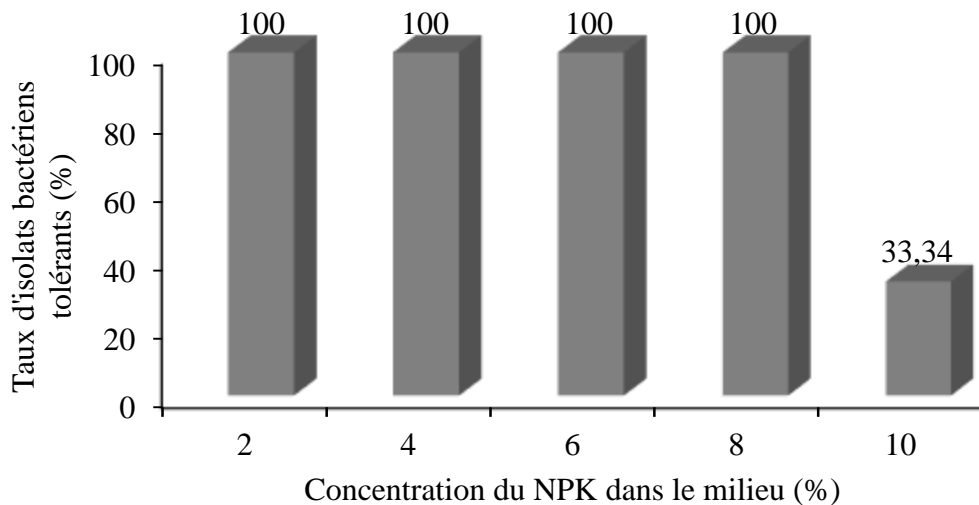


Figure 36 : Taux d'isolats bactériens tolérants en fonction de la concentration de NPK(0-23-19) dans le milieu de culture

Tableau XI : Effet de l'engrais NPK (0-23-19) sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoier

Isolats bactériens	Qualité de la croissance bactérienne				
	Concentration (%) du NPK (0-23-19)				
	2	4	6	8	10
1P	+++	+++	+++	++	+
2P	+++	+++	+++	++	+
3P	+++	+++	+++	++	++
4P	+++	+++	+++	++	+
5P	+++	+++	+++	++	+
6P	+++	+++	+++	++	+
7P	+++	+++	+++	++	+
8P	+++	+++	+++	++	+
11P	+++	+++	+++	++	+
16P	+++	+++	+++	++	+
18P	+++	+++	+++	++	+
19P	+++	+++	+++	++	+
20P	+++	+++	+++	++	+
21P	+++	+++	+++	++	+
22P	+++	+++	+++	++	++
24P	+++	+++	+++	++	+
25P	+++	+++	+++	++	+
29P	+++	+++	+++	++	+
31P	+++	+++	+++	++	+
32P	+++	+++	+++	++	+
33P	+++	+++	+++	++	+
34P	+++	+++	+++	++	+
35P	+++	+++	+++	++	+
36P	+++	+++	+++	++	+
37P	+++	+++	+++	++	+
38P	+++	+++	+++	++	+
39P	+++	+++	+++	++	+
40P	+++	+++	+++	++	+
41P	+++	+++	+++	+++	++
42P	+++	+++	+++	+++	++
46P	+++	+++	+++	+++	++
47P	+++	+++	+++	+++	++
55P	+++	+++	+++	+++	++
56P	+++	+++	+++	+++	++
58P	+++	+++	+++	+++	++
61P	+++	+++	+++	+++	++
1N	+++	+++	+++	+++	+++
3N	+++	+++	+++	+++	+++
31N	+++	+++	+++	++	+
35N	+++	+++	+++	+++	+++
37N	+++	+++	+++	+++	+++
41N	+++	+++	+++	++	+
53N	+++	+++	+++	+++	+++

Bonne croissance (+++), Croissance moyenne (++), Croissance faible (+)

7-1-4-4- Tolérance des isolats bactériens au stress acido-basique

Les endophytes bactériens du cacaoyer n'ont pas toléré les pH très acides, car au pH 3,00 aucun isolat n'a poussé (Figure 37). Au pH 3,5 trente-neuf isolats sur 45 soit 86,67 % ont pu pousser. Pour des pHs allant de 4 à 10, tous les isolats ont poussé convenablement sur le milieu. Donc la plage optimum de pH nécessaire pour la croissance des endophytes bactériens du cacaoyer a été comprise entre pH 4,00 et pH 10,00. Dans l'ensemble les endophytes ont toléré les pHs basiques plus que les pHs acides (Tableau XII).

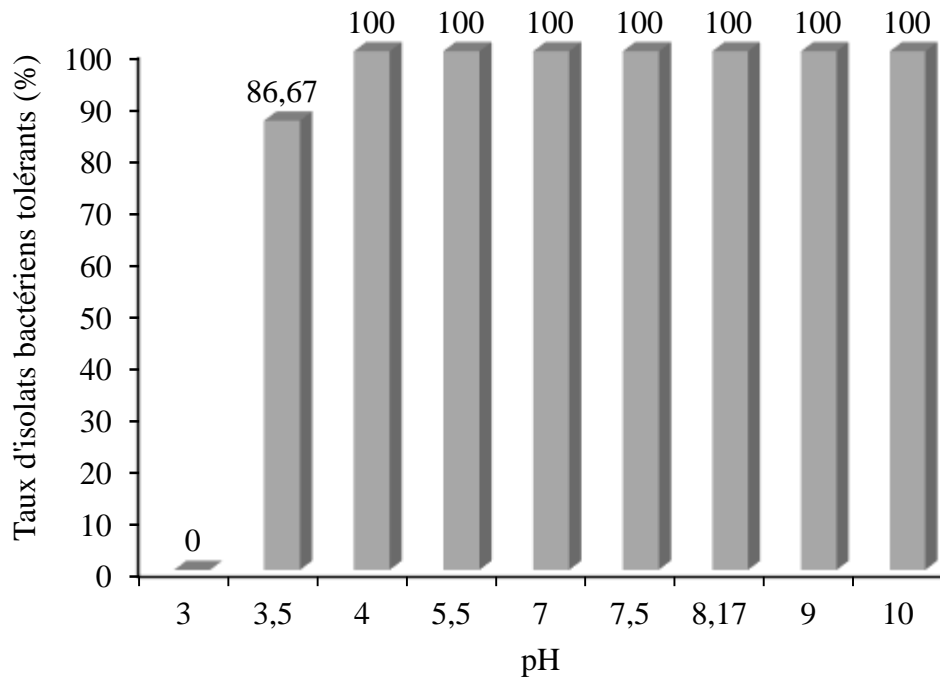


Figure 37 : Taux d'isolats bactériens tolérants en fonction du pH du milieu de culture

Tableau XII : Effet du pH sur la qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoier

Isolats bactériens	Qualité de la croissance des bactéries endophytes du cacaoier								
	pH								
	3,0	3,5	4,5	5,5	7,0	7,5	8,0	9,0	10,0
1P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
2P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
3P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
4P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
5P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
6P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
7P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
8P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
11P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
16P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
18P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
19P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
20P	-	++	++	++	++	++	++	++	++
21P	-	++	++	+++	+++	+++	++	++	++
22P	-	++	++	+	++	++	+	++	++
24P	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
25P	-	++	++	++	+++	+++	++	++	++
29P	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
30P	-	++	++	++	+++	+++	++	++	++
31P	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++
32P	-	++	+	++	+++	++	++	++	++
33P	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++
34P	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++
35P	-	++	++	++	+++	++	+	++	++
36P	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
37P	-	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
38P	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++
39P	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
40P	-	++	++	++	+++	+++	++	++	++
41P	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++
42P	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
46P	-	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
47P	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
55P	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
56P	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++
58P	-	++	++	++	+++	+++	++	++	++
61P	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++
1N	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
3N	-	++	++	++	+++	+++	++	++	++
31N	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
33N	-	++	++	++	++	++	++	++	++
35N	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
37N	-	++	++	++	+++	++	++	++	++
41N	-	++	++	++	++	++	++	++	++
53N	-	++	++	++	++	++	+	++	++

Bonne croissance (+++), Croissance moyenne (++) , Croissance faible (+), Pas de croissance (-)

7-1-5- Solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sous stress abiotiques

Les 45 isolats ayant eu des indices de solubilisation supérieurs ou égaux à 70 % et provenant des clones NA32 et P7 ont été utilisés pour étudier l'effet de différents stress abiotiques sur la solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

7-1-5-1- Solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sous stress des métaux lourds

L'effet de différentes concentrations des métaux lourds (AlCl_3 , CdCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ et du ZnSO_4) sur la survie et la capacité des isolats bactériens à solubiliser le phosphate tricalcique a été réalisé.

7-1-5-1-1- Effet du chlorure d'aluminium (AlCl_3)

Les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ont varié de 53,08 à 11,34 % respectivement pour des concentrations de chlorure d'aluminium (AlCl_3) allant de 0,5 à 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ contre un indice moyen de 100 % dans le milieu de culture PVK normal (Figure 38). La majorité des isolats bactériens a solubilisé le phosphate tricalcique en présence de différentes concentrations de chlorure d'aluminium (AlCl_3) allant de 0,5 à 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Par ailleurs, à la concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 22 isolats bactériens sur 45 ont pu solubiliser le phosphate tricalcique. L'ajout du chlorure d'aluminium au milieu de culture PVK a inhibé fortement la capacité solubilisatrice des bactéries endophytes du cacaoyer testées. Par exemple, les isolats 41P et 51N ont eu des indices de solubilisation moyens respectifs de 200 et 191 % dans le milieu PVK normal. Ces indices moyens ont baissé fortement de 50 à 10 % et de 25 à 0 % respectivement avec l'ajout du chlorure d'aluminium à des concentrations de 0,5 à 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ au milieu de culture PVK. Cependant, les isolats 37N et 21P ont montré un effet stimulateur du chlorure d'aluminium ajouté à une concentration de 0,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ au milieu de culture PVK. Ces isolats ont solubilisé respectivement le phosphate tricalcique avec des indices de solubilisation moyens respectifs de 166,67 et 100 % contre des valeurs moyennes de 100 et 81,82 % dans le milieu de culture PVK normal. Toutefois, certains isolats ont été totalement inhibés à partir de la concentration de 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de chlorure d'aluminium. Les isolats 33N, 37N et 21P ont été les plus tolérants et ont solubilisé le phosphate tricalcique avec un indice moyen de 50 % à la concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chlorure d'aluminium (Tableau XIII).

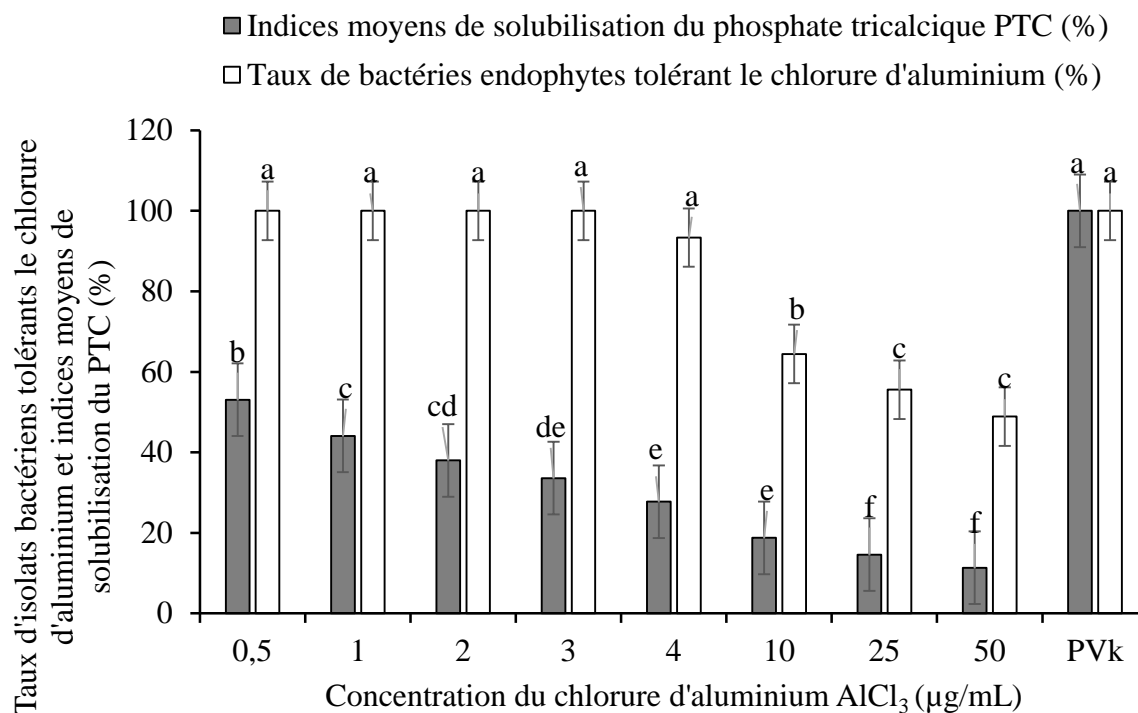


Figure 38 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en fonction de différentes concentrations de chlorure d'aluminium (AlCl_3) ajoutées au milieu de culture PVK

Les barres surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Tableau XIII : Effet du chlorure d'aluminium (AlCl₃) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique Ca₃(PO₄)₂ par les bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Indices de solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu PVK (%)								
	Concentration du chlorure d'aluminium (µg / mL)								
	0	0,5	1	2	3	4	10	25	50
41P	200	75	57,14	50	42,86	42,86	37,5	33,33	33,33
53N	191	25	12,5	11,11	11,11	11,11	0	0	0
40P	185,71	37,5	25	25	25	11,11	0	0	0
5P	160	60	50	44,44	25	20	20	20	0
42P	150	50	50	50	44,44	37,5	37,5	33,33	22,22
38P	150	71,43	71,43	50	50	37,5	37,5	28,57	25
37P	150	42,86	42,86	28,57	25	25	0	0	0
4P	142,86	33,33	22,22	11,11	10	0	0	0	0
34P	128,57	25	22,22	11,11	11,11	10	9,09	8,7	8,33
31P	114,29	57,14	50	37,5	25	22,22	0	0	0
8P	114,29	50	44,44	22,22	22,22	11,11	0	0	0
3P	114,29	66,67	50	42,86	42,86	28,57	0	0	0
33N	100	87,5	85,71	75	75	62,5	62,5	55,56	50
31N	100	66,67	44,44	37,5	37,5	28,57	25	25	12,5
58P	100	50	42,86	42,86	33,33	28,57	12,5	0	0
47P	100	28,57	11,11	9,09	9,09	9,09	0	0	0
39P	100	50	50	44,44	37,5	37,5	37,5	33,33	22,22
33P	100	50	42,86	42,86	28,57	25	25	22,22	0
32P	100	66,67	57,14	57,14	42,86	42,86	37,5	28,57	25
6P	100	75	50	50	40	22,22	22,22	20	0
20P	100	42,86	42,86	42,86	42,86	25	0	0	0
21P	100	166,67	125	112,5	100	87,5	62,5	55,56	44,44
25P	100	25	20	10	10	10	10	8	8
1N	93,33	60	50	33,33	20	20	14,29	11,11	10
2P	92,31	28,57	28,57	28,57	25	20	18,18	16,67	11,11
35N	90,91	50	33,33	25	25	25	0	0	0
18P	87,5	37,5	37,5	25	25	25	22,22	11,11	10
35P	87,5	42,86	28,57	28,57	25	25	0	0	0
36P	87,5	50	50	50	42,86	37,5	37,5	28,57	25
3N	87,5	42,86	28,57	25	25	25	12,5	0	0
46P	87,5	75	75	71,43	57,14	25	37,5	22,22	10
61P	87,5	42,86	42,86	37,5	37,5	28,57	14,29	0	0
1P	85,71	50	14,29	12,5	12,5	0	0	0	0
7P	85,71	42,86	37,5	33,33	25	25	0	0	0
11P	85,71	50	37,5	25	25	25	0	0	0
16P	85,71	50	42,86	42,86	42,86	42,86	37,5	33,33	33,33
29P	85,71	28,57	14,29	14,29	12,5	11,11	0	0	0
55P	85,71	50	42,86	42,86	42,86	37,5	37,5	25	25
56P	85,71	42,86	42,86	28,57	28,57	25	0	0	0
41N	83,33	75	62,5	37,5	28,57	25	25	12,5	12,5
37N	81,82	100	85,71	83,33	83,33	75	57,14	50	50
30P	80	16,67	14,29	12,5	12,5	0	0	0	0
19P	75	50	50	50	42,86	37,5	33,33	25	22,22
22P	75	50	50	50	37,5	37,5	28,57	25	25
24P	75	50	44,44	44,44	44,44	40	33,33	25	25

7-1-5-1-2- Effet du chlorure de cadmium (CdCl₂)

Les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ont varié de 57 à 8,55 % respectivement pour des concentrations allant de 0,5 à 50 µg / ml de chlorure de cadmium (CdCl₂) contre une valeur moyenne de 100 % dans le milieu de culture PVK normal (Figure 39). De même, 40 (88,89 %) des isolats bactériens ont pu solubiliser le phosphate tricalcique à des concentrations de 0,5 à 3 µg / mL contre 25 isolats à la concentration de 50 µg / mL. L'ajout du chlorure de cadmium dans le milieu de culture PVK a inhibé fortement la capacité des bactéries endophytes du cacaoyer à solubiliser le phosphate tricalcique. En effet, les indices de solubilisation du phosphate tricalcique de la majorité des isolats ont été fortement réduits avec la présence du chlorure de cadmium dans le milieu de culture. Par exemple, les isolats 41P, 53N et 40P ont solubilisé le phosphate tricalcique dans le milieu PVK normal avec des indices moyens de 200 ; 191 et 185,71 %. Ces indices ont drastiquement baissé avec l'ajout de différentes concentrations de chlorure de cadmium allant de 0,5 à 50 µg / mL au milieu de culture PVK. Cependant, les isolats 46P et 37N ont montré un effet stimulateur du chlorure de cadmium ajouté à la concentration de 0,5 µg/mL dans le milieu de culture PVK. Ces isolats ont montré respectivement des indices moyens 100 et 185,71 % de solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu de culture PVK additionné de 0,5 µg/mL de chlorure de cadmium. Or ces indices ont été respectivement 87,5 et 81,82 % dans le milieu de culture PVK normal. Les isolats 21P, 46P et 37N ont toléré le chlorure de cadmium à la concentration de 50 µg / mL et ont solubilisé le phosphate tricalcique avec des indices moyens respectifs de 37,5 et 28,57 % (Tableau XIV).

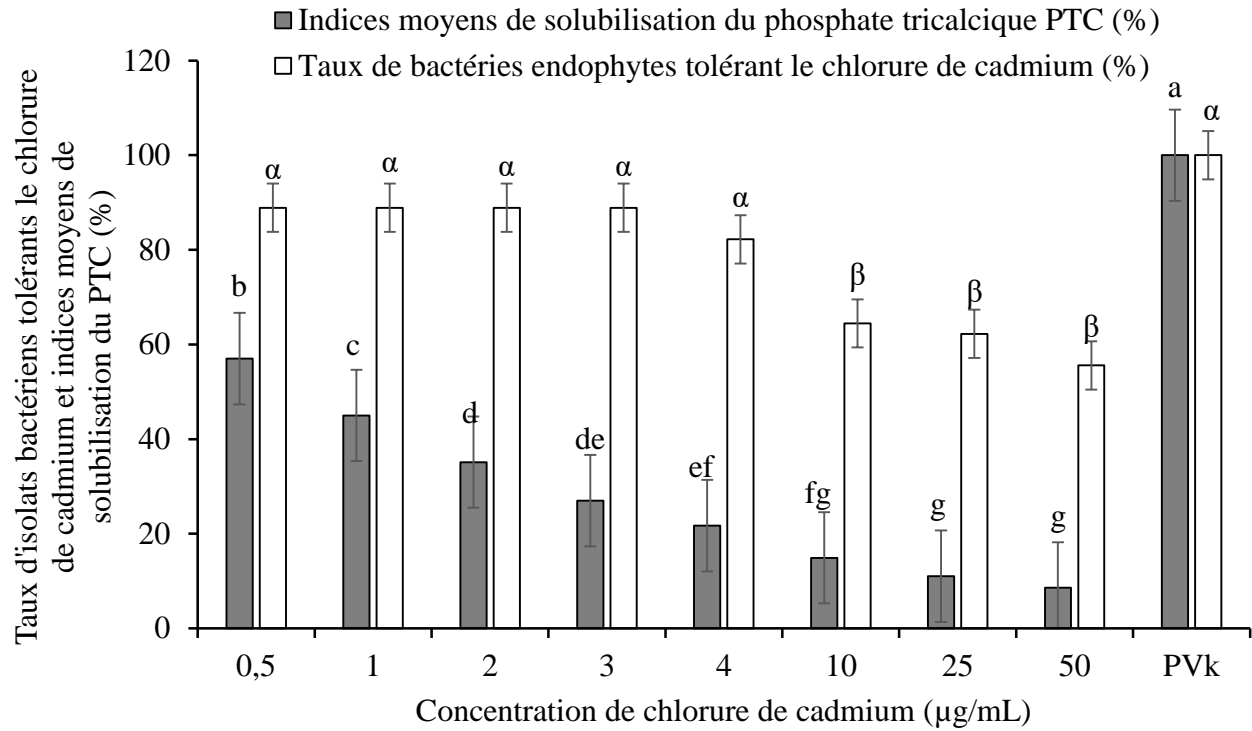


Figure 39 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction de différentes concentrations de chlorure de cadmium (CdCl_2) ajoutées au milieu de culture PVK

Les barres surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Tableau XIV : Effet du Chlorure de cadmium (CdCl₂) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique (Ca₃(PO₄)₂) par les bactéries endophytes du cacaoyer

Indices de solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu PVK (%)									
Isolats bactériens	Concentration du chlorure de cadmium (µg / mL)								
	0	0,5	1	2	3	4	10	25	50
41P	200	50	50	37,5	25	25	25	11,11	10
53N	191	25	37,5	12,5	0	12,5	0	0	0
40P	185,71	66,67	42,86	28,57	22,22	14,29	12,5	12,5	11,11
5P	160	14,29	14,29	12,5	12,5	11,11	0	0	0
42P	150	75	50	37,5	37,5	25	22,22	12,5	12,5
38P	150	85,71	71,43	71,43	42,86	28,57	28,57	16,67	14,29
37P	150	42,86	28,57	25	25	16,67	14,29	14,29	0
4P	142,86	16,67	14,29	12,5	11,11	10	0	0	0
34P	128,57	0	0	0	0	0	0	0	0
31P	114,29	75	37,5	25	0	0	0	0	0
8P	114,29	57,14	57,14	42,86	42,86	33,33	22,22	20	14,29
3P	114,29	33,33	33,33	28,57	28,57	28,57	25	22,22	12,5
33N	100	150	75	75	71,43	22,22	0	0	0
31N	100	85,71	50	42,86	37,5	28,57	25	14,29	12,5
58P	100	66,67	42,86	40	33,33	28,57	28,57	14,29	14,29
47P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
39P	100	62,5	62,5	62,5	25	25	25	25	25
33P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
32P	100	42,86	25	12,5	0	0	0	0	0
6P	100	50	42,86	42,86	37,5	37,5	25	22,22	20
20P	100	57,14	50	28,57	16,67	14,29	12,5	0	0
21P	100	100	85,71	75	71,43	71,43	37,5	37,5	37,5
25P	100	40,2	40	25	25	10	10	10	0
1N	93,33	75	75	62,5	50	25	0	0	0
2P	92,31	25	25	25	25	25	25	20	10
35N	90,91	71,43	28,57	25	25	14,29	0	0	0
18P	87,5	50	42,86	28,57	14,29	12,5	12,5	12,5	12,5
35P	87,5	0	0	0	0	0	0	0	0
36P	87,5	87,5	87,5	62,5	42,86	28,57	28,57	28,57	12,5
3N	87,5	128,57	100	57,14	50	42,86	28,57	14,29	12,5
46P	87,5	100	100	85,71	55,56	50	42,86	28,57	28,57
61P	87,5	83,33	71,43	62,5	57,14	42,86	33,33	14,29	12,5
1P	85,71	75	25	25	12,5	12,5	11,11	9,09	0
7P	85,71	57,14	57,14	57,14	42,86	42,86	0	0	0
11P	85,71	66,67	57,14	57,14	50	28,57	22,22	12,5	11,11
16P	85,71	37,5	33,33	28,57	25	25	20	12,5	10
29P	85,71	0	0	0	0	0	0	0	0
55P	85,71	50	37,5	37,5	28,57	16,67	14,29	14,29	12,5
56P	85,71	57,14	42,86	25	14,29	14,29	12,5	12,5	12,5
41N	83,33	14,29	62,5	12,5	12,5	14,29	0	0	0
37N	81,82	185,71	100	71,43	71,43	71,43	42,86	37,5	28,57
30P	80	75	57,14	37,5	0	0	0	0	0
19P	75	42,86	28,57	28,57	25	25	25	12,5	12,5
22P	75	42,86	37,5	25	14,29	14,29	12,5	12,5	12,5
24P	75	42,86	42,86	28,57	28,57	28,57	25	22,22	12,5

7-1-5-1-3- Effet du chlorure de cobalt (CoCl₂)

Les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ont varié de 44,27 à 4,28 % respectivement pour des concentrations allant de 0,5 à 50 µg / mL de chlorure de cobalt contre une valeur moyenne de 100 % dans le milieu de culture PVK normal (Figure 40). De même, le nombre d'isolats bactériens qui ont pu solubiliser le phosphate tricalcique ont été de 34 (75,56 %) et 12 (26,67 %) respectivement à des concentrations de 0,5 et 50 µg / mL de chlorure de cobalt. L'ajout du chlorure de cobalt au milieu de culture PVK a inhibé fortement la capacité des bactéries endophytes du cacaoyer a solubilisé le phosphate tricalcique. Ce composé a été toxique pour certains isolats bactériens préalablement identifiés comme ayant solubilisé plus le phosphate tricalcique dans le milieu de culture PVK normal (0 µg / mL de CoCl₂). L'ajout du chlorure de cobalt a réduit voire même a annulé les indices de solubilisation de la majorité des bactéries endophytes comme les isolats 53N et 40P. L'isolat 21P a montré un effet stimulant du chlorure de cobalt lorsqu'il a été ajouté à une concentration de 0,5 µg / mL au milieu de culture PVK. En effet, cet isolat bactérien a montré un indice moyen de solubilisation du phosphate tricalcique d'une valeur de 114,29 % contre une valeur moyenne de 100 % dans le milieu PVK normal. Les isolats bactériens 41P, 5P, 39P, 37N et 2P ont pu tolérer le chlorure de cobalt à des concentrations allant de 0,5 à 50 µg / mL. Ces isolats ont aussi solubilisé faiblement le phosphate tricalcique à ces différentes concentrations du chlorure de cobalt (Tableau XV).

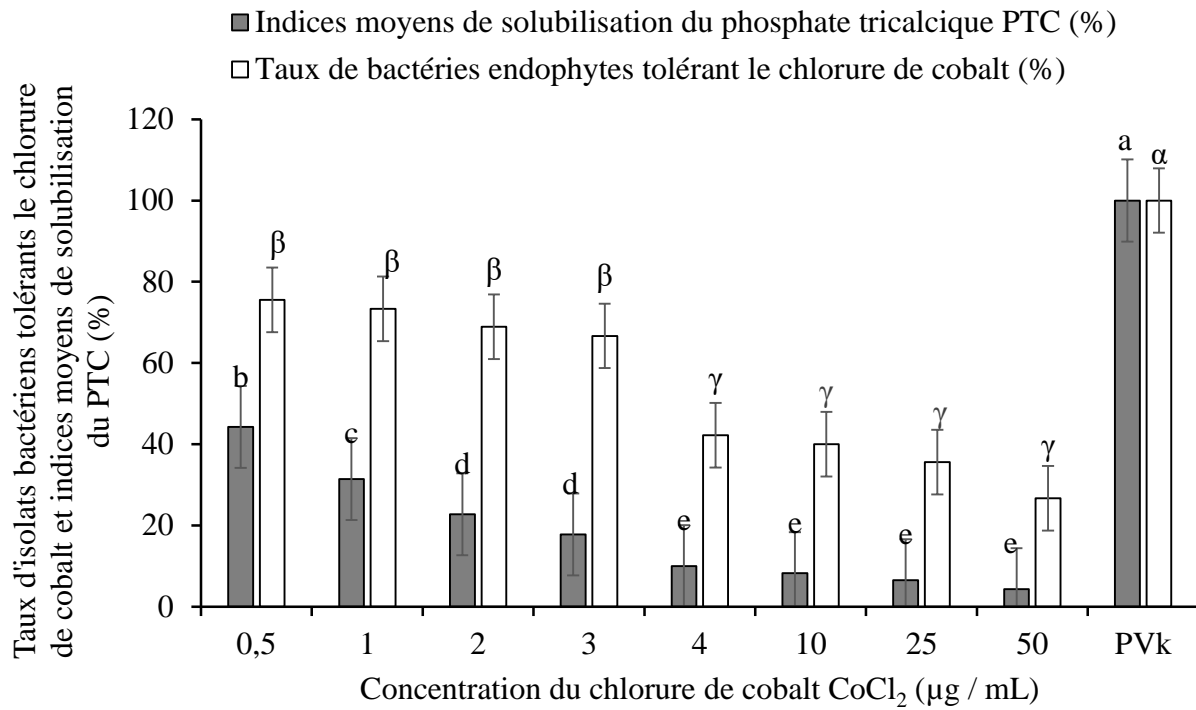


Figure 40 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en fonction de différentes concentrations de chlorure de cobalt (CoCl_2) ajoutées au de culture milieu PVK

Les barres surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0,0001$) selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Tableau XV : Effet du chlorure de cobalt (CoCl₂) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique (Ca₃(PO₄)₂) par les bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Indices de solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu PVK (%)								
	Concentration du chlorure de cobalt (µg / mL)								
	0	0,5	1	2	3	4	1	25	50
41P	200	42,86	42,86	42,86	28,57	28,57	28,57	28,57	28,57
53N	191	0	0	0	0	0	0	0	0
40P	185,71	0	0	0	0	0	0	0	0
5P	160	111,11	75	57,14	55,56	55,56	42,86	37,5	33,33
42P	150	57,14	37,5	25	25	14,29	14,29	14,29	12,5
38P	150	42,86	42,86	42,86	42,86	28,57	16,67	16,67	12,5
37P	150	50	42,86	28,57	28,57	0	0	0	0
4P	142,86	0	0	0	0	0	0	0	0
34P	128,57	25	22,22	12,5	11,11	0	0	0	0
31P	114,29	50	25	0	0	0	0	0	0
8P	114,29	0	0	0	0	0	0	0	0
3P	114,29	71,43	25	12,5	12,5	0	0	0	0
33N	100	100	62,5	0	0	0	0	0	0
31N	100	71,43	71,43	37,5	14,29	14,29	12,5	12,5	0
58P	100	60	42,86	28,57	16,67	16,67	14,29	14,29	12,5
47P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
39P	100	71,43	42,86	42,86	33,33	28,57	28,57	28,57	14,29
33P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
32P	100	28,57	28,57	25	12,5	0	0	0	0
6P	100	71,43	42,86	28,57	28,57	25	25	0	0
20P	100	28,57	25	12,5	12,5	0	0	0	0
21P	100	114,29	57,14	57,14	50	16,67	16,67	14,29	12,5
25P	100	45	40	28	28	0	0	0	0
1N	93,33	37,5	25	0	0	0	0	0	0
2P	92,31	0	0	0	0	0	0	0	0
35N	90,91	28,57	28,57	25	25	12,5	0	0	0
18P	87,5	42,86	14,29	12,5	0	0	0	0	0
35P	87,5	0	0	0	0	0	0	0	0
36P	87,5	42,86	42,86	42,86	42,86	14,29	12,5	12,5	12,5
3N	87,5	28,57	28,57	25	25	20	12,5	12,5	0
46P	87,5	85,71	71,43	50	37,5	25	12,5	11,11	11,11
61P	87,5	71,43	42,86	42,86	42,86	33,33	33,33	16,67	14,29
1P	85,71	157,14	100	71,43	25	25	11,11	0	0
7P	85,71	42,86	33,33	28,57	12,5	0	0	0	0
11P	85,71	33,33	33,33	28,57	14,29	0	0	0	0
16P	85,71	57,14	42,86	33,33	25	16,67	16,67	16,67	14,29
29P	85,71	0	0	0	0	0	0	0	0
55P	85,71	100	57,14	37,5	25	0	0	0	0
56P	85,71	37,5	14,29	12,5	12,5	12,5	12,5	10	0
41N	83,33	0	0	0	0	0	0	0	0
37N	81,82	71,43	60,67	50	40,86	40,86	40,86	30,33	15
30P	80	0	0	0	0	0	0	0	0
19P	75	42,86	33,33	28,57	28,57	0	0	0	0
22P	75	28,57	25	25	12,5	0	0	0	0
24P	75	42,86	28,57	28,57	28,57	20	16,67	14,29	14,29

7-1-5-1-4- Effet du sulfate de cuivre (CuSO₄)

Les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ont varié de 45,68 à 5,24 % respectivement pour des concentrations allant de 0,5 à 50 µg / mL de sulfate de cuivre (Figure 41). Par ailleurs, 38 isolats bactériens (84,45 %) et 15 isolats (33,34 %) ont pu solubiliser le phosphate tricalcique à des concentrations de 0,5 et 50 µg / mL de sulfate de cuivre. L'ajout du sulfate de cuivre au milieu de culture PVK a inhibé fortement la capacité des bactéries endophytes du cacaoyer à solubiliser le phosphate tricalcique. En effet, les indices de solubilisation montrés par les isolats bactériens dans le milieu de culture PVK normal ont été réduits voire même annulés avec l'apport du sulfate de cuivre à différentes concentrations allant de 0,5 à 50 µg/mL au milieu PVK. Certains isolats comme 41P, 53N et 40P ont montré les indices de solubilisation les plus élevés dans le milieu de culture PVK. Avec l'apport du sulfate de cuivre, les indices de solubilisation du phosphate tricalcique de ces isolats bactériens ont baissé de 57,14 à 14,29 % ; 50 à 0 % et de 28,57 à 0 % respectivement. Cependant, les isolats 36P et 37N ont montré un effet stimulateur du sulfate de cuivre ajouté à une concentration de 0,5 µg / mL. Ces isolats ont montré des indices de solubilisation de 128,57 et 133,33 % contre des valeurs moyennes de 87,5 et 81,82 % respectivement dans le milieu PVK normal (Tableau XVI).

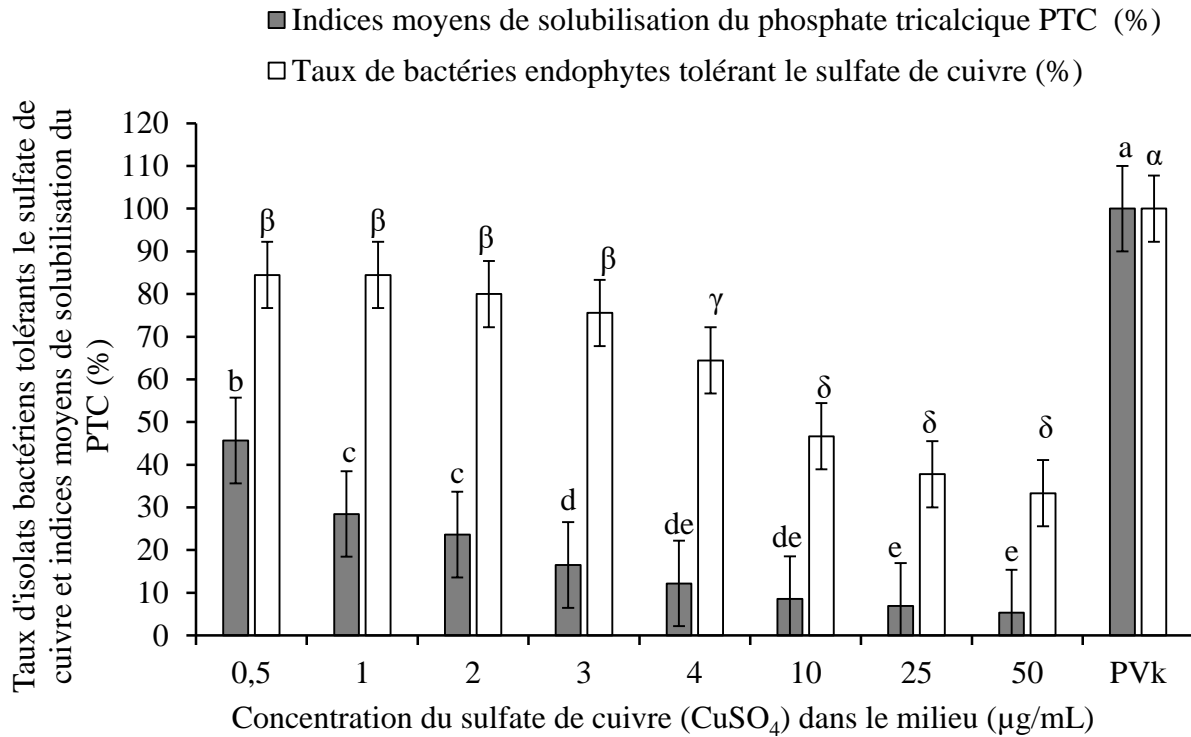


Figure 41 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en fonction de différentes concentrations de sulfate de cuivre (CuSO_4) ajoutées au milieu de culture PVK

Les barres surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Tableau XVI : Effet du sulfate de cuivre (CuSO₄) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique (Ca₃(PO₄)₂) par les bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Indices de solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu PVK (%)								
	Concentration du sulfate de cuivre (µg / mL)								
	0	0,5	1	2	3	4	10	25	50
41P	200	57,14	50	50	40	28,57	25	25	14,29
53N	191	50	25	22,22	6,67	0	0	0	0
40P	185,71	28,57	25	22,22	12,5	12,5	0	0	0
5P	160	0	0	0	0	0	0	0	0
42P	150	71,43	37,5	37,5	33,33	25	22,22	22,22	20
38P	150	87,5	75	62,5	50	25	25	25	25
37P	150	100	28,57	25	20	20	0	0	0
4P	142,86	25	14,29	12,5	0	0	0	0	0
34P	128,57	0	0	0	0	0	0	0	0
31P	114,29	0	0	0	0	0	0	0	0
8P	114,29	33,33	25	20	11,11	10	0	0	0
3P	114,29	28,57	25	12,5	12,5	0	0	0	0
33N	100	57,14	50	50	42,86	25	0	0	0
31N	100	44,44	33,33	25	20	12,5	12,5	11,11	0
58P	100	16,67	14,29	14,29	12,5	12,5	12,5	0	0
47P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
39P	100	62,5	50	50	37,5	37,5	37,5	33,33	25
33P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
32P	100	57,14	33,33	33,33	14,29	14,29	12,5	12,5	11,11
6P	100	50	22,22	22,22	20	20	11,11	0	0
20P	100	11,11	11,11	10	9,09	9,09	0	0	0
21P	100	66,67	62,5	62,5	55,56	40	30	30	27,27
25P	100	55	30	30	15	11	10	10	0
1N	93,33	0	0	0	0	0	0	0	0
2P	92,31	25	25	11,11	11,11	0	0	0	0
35N	90,91	42,86	25	25	22,22	12,5	0	0	0
18P	87,5	50	50	37,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
35P	87,5	0	0	0	0	0	0	0	0
36P	87,5	128,57	114,29	62,5	37,5	25	25	14,29	11,11
3N	87,5	28,57	28,57	25	12,5	12,5	12,5	0	0
46P	87,5	85,71	44,44	25	20	11,11	11,11	10	10
61P	87,5	28,57	28,57	28,57	28,57	28,57	14,29	0	0
1P	85,71	75	22,22	0	0	0	0	0	0
7P	85,71	33,33	28,57	25	11,11	11,11	0	0	0
11P	85,71	42,86	25	12,5	11,11	0	0	0	0
16P	85,71	50	44,44	37,5	14,29	12,5	12,5	12,5	12,5
29P	85,71	100	12,5	11,11	11,11	11,11	0	0	0
55P	85,71	87,5	25	22,22	20	14,29	12,5	12,5	12,5
56P	85,71	14,29	12,5	11,11	0	0	0	0	0
41N	83,33	22,22	12,5	11,11	11,11	0	0	0	0
37N	81,82	133,33	50	37,5	37,5	33,33	28,57	25	14,29
30P	80	50	20	0	0	0	0	0	0
19P	75	50	50	37,5	25	25	25	25	12,5
22P	75	55,56	50	50	20	11,11	10	10	10
24P	75	50	44,44	33,33	25	25	22,22	22,22	22,22

7-1-5-1-5- Effet de l'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

Les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ont varié de 60,5 à 12,47 % respectivement pour des concentrations d'acétate de plomb allant de 0,5 à 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ contre une valeur moyenne de 100 % dans le milieu de culture PVK normal (Figure 42). De même, 100 à 84 % des isolats bactériens ont été capables de solubiliser le phosphate tricalcique et de tolérer l'acétate de plomb à des concentrations de 0,5 et 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ contre 36 isolats bactériens (77,78 %) à la concentration de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$. L'ajout de l'acétate de plomb au milieu de culture PVK a inhibé fortement la capacité des bactéries endophytes du cacaoyer a solubilisé le phosphate tricalcique. En effet, l'apport de l'acétate de plomb a réduit voire même a annulé les indices de solubilisation pour des concentrations allant de 0,5 à 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Certains isolats bactériens comme 4P, 33N, 40P, 6P et 1P n'ont pas pu solubiliser le phosphate tricalcique en présence d'une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'acétate de plomb ajoutée. Toutefois, les isolats bactériens 36P et 55P ont montré un effet stimulateur de l'acétate de plomb ajouté à une concentration de 0,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ au milieu de culture PVK. Ces isolats ont montré des indices moyens de 114,29 et 116,67 % contre des valeurs moyennes respectives de 87,5 et 85,71 % dans le milieu de culture PVK normal (Tableau XVII).

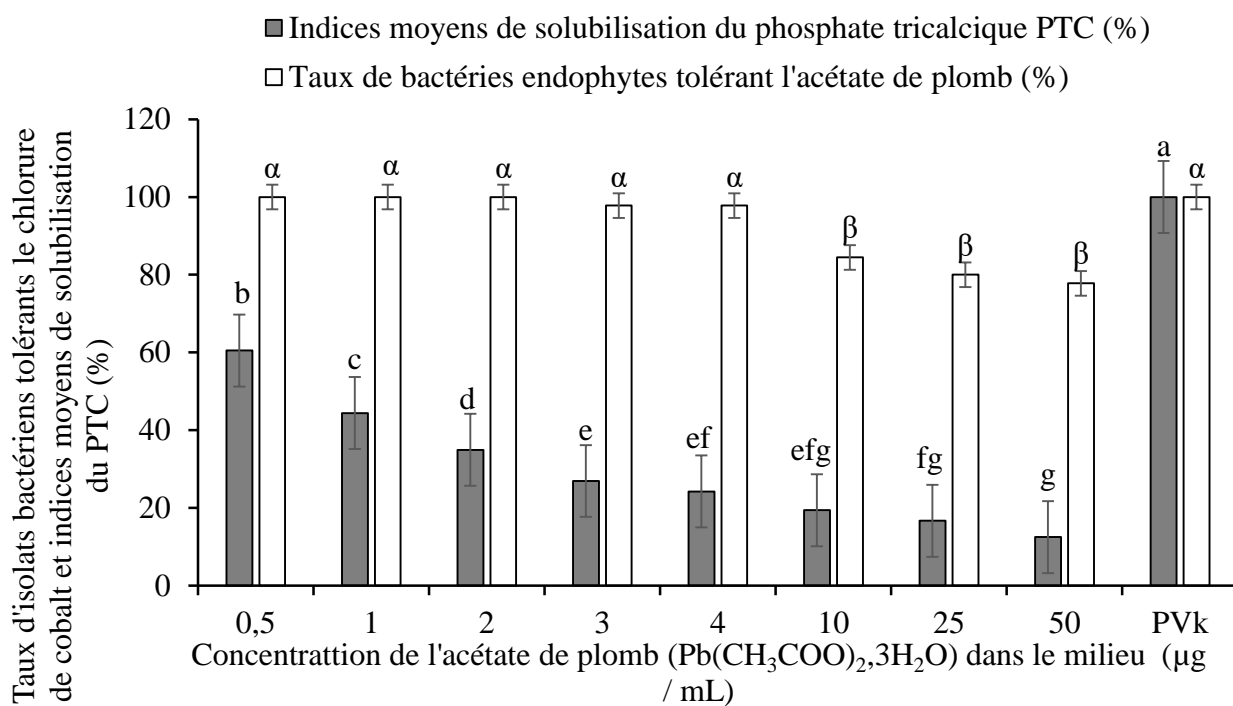


Figure 42 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique en fonction de différentes concentrations d'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2, 3\text{H}_2\text{O}$) ajoutées au milieu de culture PVK

Les barres surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Tableau XVII : Effet de l'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer

Indices de solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu PVK (%)									
Isolats bactériens	Concentration de l'acétate de plomb ($\mu\text{g} / \text{mL}$)								
	0	0,5	1	2	3	4	10	25	50
41P	200	57,14	57,14	42,86	42,86	37,5	37,5	37,5	11,11
53N	191	87,5	75	50	16,67	12,5	12,5	11,11	11,11
40P	185,71	42,86	37,5	28,57	25	22,22	0	0	0
5P	160	37,5	25	25	23,08	22,22	22,22	15,79	16,67
42P	150	150	85,71	50	50	50	42,86	37,5	37,5
38P	150	42,86	42,86	37,5	28,57	25	25	25	12,5
37P	150	50	28,57	25	25	25	25	22,22	14,29
4P	142,86	37,5	22,22	11,11	11,11	10	0	0	0
34P	128,57	66,67	33,33	25	22,22	15,38	12,5	12,5	11,11
31P	114,29	57,14	50	28,57	12,5	12,5	12,5	12,5	11,11
8P	114,29	62,5	62,5	57,14	42,86	42,86	33,33	30	20
3P	114,29	66,67	62,5	50	42,86	28,57	28,57	25	12,5
33N	100	37,5	20	20	10	8,33	0	0	0
31N	100	42,86	37,5	37,5	28,57	28,57	25	25	25
58P	100	42,86	28,57	28,57	28,57	25	25	12,5	12,5
47P	100	37,5	28,57	22,22	11,11	9,09	8,33	7,14	7,69
39P	100	100	85,71	57,14	50	42,86	37,5	37,5	25
33P	100	100	50	42,86	16,67	14,29	12,5	12,5	12,5
32P	100	50	14,29	14,29	12,5	12,5	12,5	12,5	11,11
6P	100	42,86	42,86	37,5	25	25	0	0	0
20P	100	33,33	14,29	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	11,11
21P	100	100	100	87,5	60	40	37,5	25	12,5
25P	100	45	28	15	15	15	10	10	10
1N	93,33	85,71	75	20	12,5	11,11	10	8,33	0
2P	92,31	62,5	42,86	42,86	28,57	25	25	22,22	12,5
35N	90,91	57,14	37,5	25	25	25	0	0	0
18P	87,5	28,57	25	12,5	12,5	12,5	11,11	0	0
35P	87,5	25	25	25	12,5	12,5	11,11	11,11	10
36P	87,5	114,29	71,43	57,14	37,5	37,5	28,57	25	22,22
3N	87,5	37,5	37,5	33,33	28,57	25	25	25	14,29
46P	87,5	57,14	50	37,5	37,5	30	25	25	12,5
61P	87,5	37,5	37,5	37,5	28,57	28,57	25	25	12,5
1P	85,71	62,5	50	42,86	42,86	25	0	0	0
7P	85,71	66,67	42,86	42,86	37,5	33,33	25	0	0
11P	85,71	85,71	66,67	66,67	62,5	50	42,86	37,5	25
16P	85,71	50	37,5	33,33	28,57	28,57	28,57	25	12,5
29P	85,71	50	25	16,67	16,67	14,29	14,29	12,5	12,5
55P	85,71	116,67	50	37,5	28,57	28,57	28,57	25	25
56P	85,71	28,57	25	25	25	25	25	12,5	10
41N	83,33	57,14	57,14	42,86	42,86	37,5	37,5	37,5	11,11
37N	81,82	42,86	42,86	42,86	42,86	50	33,33	33,33	33,33
30P	80	14,29	14,29	14,29	0	0	0	0	0
19P	75	100	42,86	42,86	37,5	37,5	25	25	25
22P	75	50	25	25	14,29	14,29	14,29	12,5	12,5
24P	75	42,86	42,86	25	25	25	25	25	25

7-1-5-1-6- Effet du sulfate de zinc (ZnSO₄)

Les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique ont varié de 38,17 à 2,03 % respectivement pour des concentrations allant de 0,5 à 50 µg / mL de sulfate de zinc contre la valeur moyenne de 100 % de l'indice solubilisation dans le milieu PVK normal (Figure 43). De même, 34 isolats bactériens (77, 78 %) et 7 (15,56 %) ont pu solubiliser le phosphate tricalcique à des concentrations de 0,5 et 50 µg / mL de sulfate de zinc. L'ajout du sulfate de zinc au milieu de culture PVK a inhibé fortement la capacité des bactéries endophytes du cacaoyer a solubilisé le phosphate tricalcique. Car, les indices moyens de solubilisation de la majorité des isolats ont baissé drastiquement avec l'ajout de différentes concentrations allant de 0,5 à 50 µg/mL de sulfate de zinc. Certains isolats bactériens tels que 40P, 4P, 3P, 33P et autres ont été totalement inhibé à partir d'une concentration de 0,5 µg / mL de sulfate de zinc ajoutée au milieu de culture PVK. Toutefois, l'isolat bactérien 37N a montré un effet stimulateur du sulfate de zinc ajouté à une concentration de 0,5 µg/mL. En effet, à cette concentration du sulfate de zinc l'isolat 37N a montré un indice moyen de 180 % contre une valeur moyenne de 81,82 % dans le milieu de culture PVK normal (Tableau XVIII).

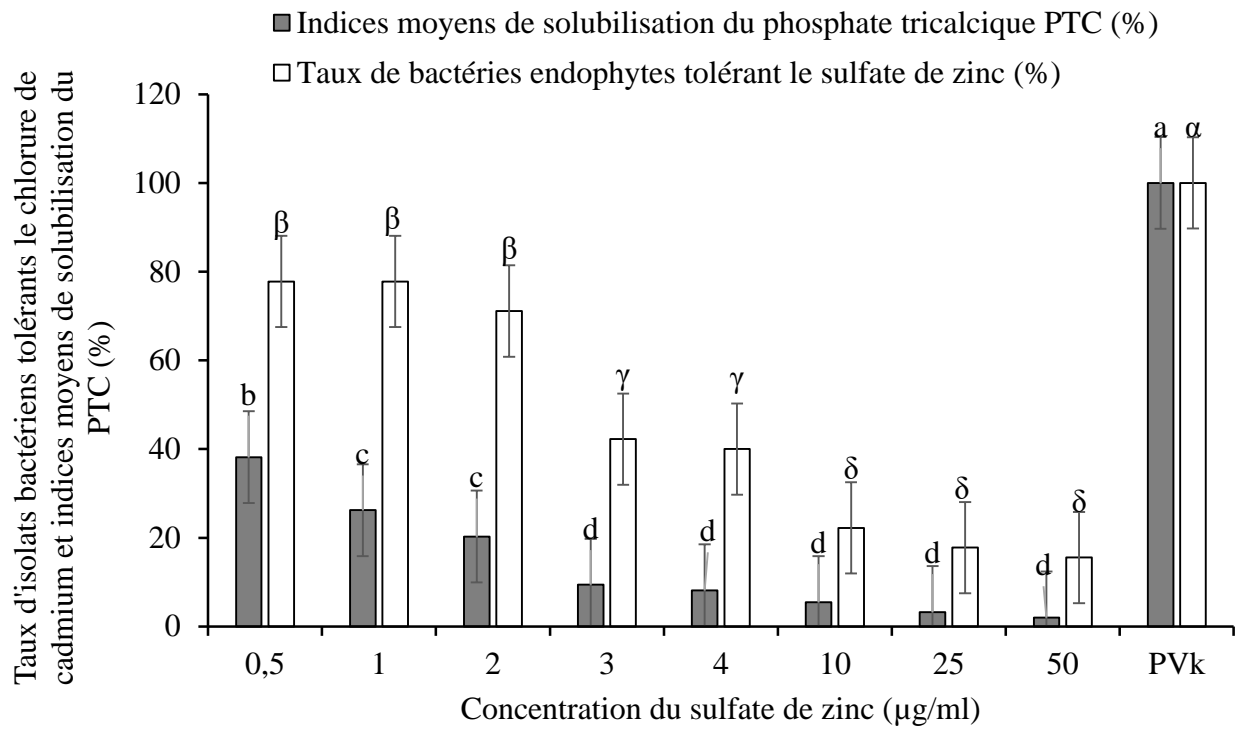


Figure 43 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en fonction de différentes concentrations de sulfate de zinc (ZnSO_4) ajoutées au milieu de culture PVK

Les barres surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Tableau XVIII : Effet du sulfate de zinc ($ZnSO_4$) sur la qualité de solubilisation du phosphate tricalcique ($Ca_3(PO_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Indices de solubilisation du phosphate tricalcique dans le milieu PVK (%)								
	Concentration du sulfate de zinc ($\mu g / mL$)								
	0	0,5	1	2	3	4	10	25	50
41P	200	50	37,5	37,5	25	25	0	0	0
53N	191	14,29	12,5	0	0	0	0	0	0
40P	185,71	0	0	0	0	0	0	0	0
5P	160	40	25	12,5	12,5	11,11	0	0	0
42P	150	55,56	50	33,33	25	25	25	11,11	11,11
38P	150	66,67	42,86	37,5	37,5	37,5	28,57	25	12,5
37P	150	57,14	50	28,57	22,22	12,5	0	0	0
4P	142,86	0	0	0	0	0	0	0	0
34P	128,57	75	44,44	33,33	12,5	12,5	11,11	10	10
31P	114,29	22,22	22,22	20	11,11	10	0	0	0
8P	114,29	50	30	25	0	0	0	0	0
3P	114,29	0	0	0	0	0	0	0	0
33N	100	87,5	80	80	0	0	0	0	0
31N	100	50	25	25	0	0	0	0	0
58P	100	42,86	28,57	28,57	0	0	0	0	0
47P	100	10	6,25	0	0	0	0	0	0
39P	100	50	50	37,5	28,57	28,57	11,11	0	0
33P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
32P	100	0	0	0	0	0	0	0	0
6P	100	42,86	33,33	33,33	28,57	25	25	25	0
20P	100	25	12,5	11,11	0	0	0	0	0
21P	100	85,71	50	50	37,5	14,29	14,29	12,5	11,11
25P	100	25	12	12	0	0	0	0	0
1N	93,33	0	0	0	0	0	0	0	0
2P	92,31	0	0	0	0	0	0	0	0
35N	90,91	25	12,5	12,5	0	0	0	0	0
18P	87,5	25	12,5	12,5	0	0	0	0	0
35P	87,5	25	12,5	12,5	11,11	11,11	10	0	0
36P	87,5	50	37,5	28,57	28,57	28,57	25	0	0
3N	87,5	50	28,57	28,57	0	0	0	0	0
46P	87,5	85,71	50	25	22,22	20	18,18	8,33	8,33
61P	87,5	83,33	42,86	25	0	0	0	0	0
1P	85,71	0	0	0	0	0	0	0	0
7P	85,71	20	10	0	0	0	0	0	0
11P	85,71	33,33	28,57	25	0	0	0	0	0
16P	85,71	42,86	42,86	25	22,22	20	18,18	10	10
29P	85,71	0	0	0	0	0	0	0	0
55P	85,71	57,14	57,14	22,22	0	0	0	0	0
56P	85,71	50	50	37,5	12,5	12,5	0	0	0
41N	83,33	0	0	0	0	0	0	0	0
37N	81,82	180	80	71,43	50	50	50	44,44	28,57
30P	80	37,5	33,33	22,22	0	0	0	0	0
19P	75	50	37,5	20	12,5	11,11	0	0	0
22P	75	20	12,5	12,5	12,5	12,5	10	0	0
24P	75	33,33	28,57	28,57	12,5	0	0	0	0

7-1-5-2- Sélection des isolats multi-résistants aux métaux lourds par analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) a permis de catégoriser les isolats en fonction de leur capacité à solubiliser le phosphate tricalcique en présence de différents métaux lourds. Sur la base de leurs parts explicatives à trois quarts de la variabilité totale, deux axes principaux (Dim1 et Dim2) ont été retenus. Ces axes (Dim1 et Dim2) ont constitué la composante principale qui a expliqué 75,81 % de la variabilité. Leur contribution individuelle respective a été de 63,75 % et de 12,06 % (Figure 44). La représentation des différents métaux lourds selon les deux axes a permis de répartir ceux-ci en deux groupes dont le premier groupe est composé des métaux ayant des effets fortement corrélés. Ce groupe est constitué par le cuivre (Cu), l'aluminium (Al), le cobalt (Co), le cadmium (Cd) et le zinc (Zn). Le deuxième groupe est constitué par le plomb (Pb) seul (Figure 44). La représentation des isolats suivant ces deux axes s'est faite selon la sensibilité et la résistance de ceux-ci à ces métaux lourds. Les isolats qui s'alignent suivant l'axe 1 (Dim1) ont été représentés de la gauche vers la droite du plus sensible au plus résistant. Ainsi, les isolats 21P, 37N, 41P, 46P et 38P ont été résistants à au moins l'un des métaux lourds ayant contribué à la formation de l'axe 1 (Dim1). Par ailleurs, les isolats qui se répartissent du bas vers le haut suivant l'axe 2 (Dim2) ont été sensibles ou résistants au plomb. Ainsi, les isolats 42P, 11P, 21P ont été plus tolérants au plomb que les isolats 33N et 37N. La projection des isolats sur le plan formé par les axes (Dim1 et Dim2) de l'ACP, a permis de regrouper les isolats bactériens en trois catégories selon leur capacité à solubiliser le phosphate tricalcique en présence des différents métaux lourds (Figure 45). La première catégorie ou cluster 1 est représentée par les individus qui ont été plus sensibles à l'ensemble des métaux lourds utilisés dans cette étude. La deuxième catégorie ou cluster 2 représente les isolats qui ont été moyennement tolérants à ces métaux lourds avec des indices de solubilisation faibles. Contrairement aux deux premières catégories, la troisième catégorie ou cluster 3 est constituée par les isolats 21P et 37N, qui ont été multi-résistants à au moins deux métaux lourds utilisés. Par ailleurs, ces isolats sont opposés par rapport à leur sensibilité au plomb. Car l'isolat 21P solubilise moyennement le phosphate tricalcique en présence du plomb, contrairement à l'isolat 37N qui a un indice de solubilisation plus bas en présence du plomb.

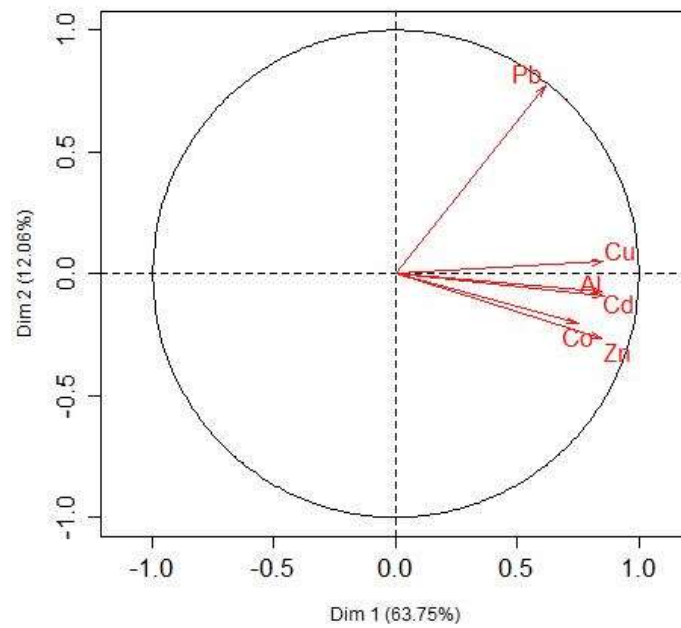


Figure 44 : Cercle de corrélation des métaux lourds dans le plan formé par les axes (Dim1 et Dim 2) de l'analyse en composantes principales (ACP)

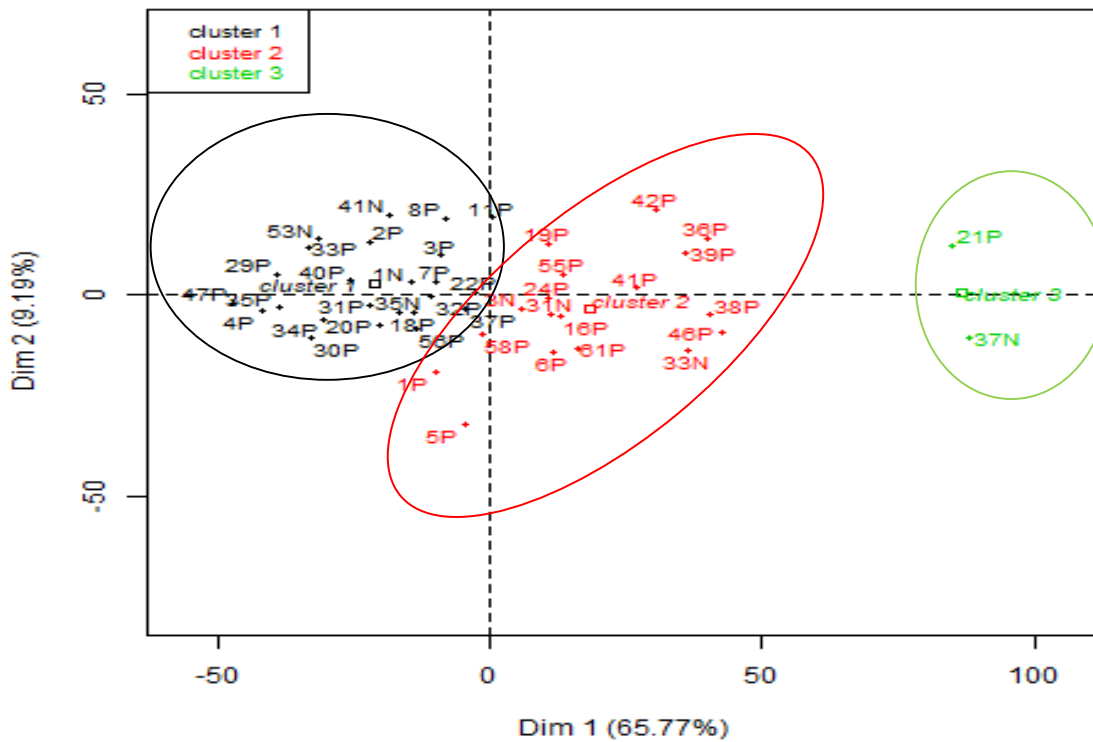


Figure 45 : Projection des isolats bactériens dans le plan formé par les axes (Dim1 et Dim2) de l'analyse en composantes principales (ACP)

7-1-5-3- Effet du stress salin sur la capacité solubilisatrice des bactéries endophytes du cacaoyer

Les indices moyens de solubilisation ont varié de 51,62 à 28,34 % respectivement pour des concentrations de 0 à 8 % de chlorure de sodium. Par ailleurs, 34 (77,78 %) et 7 (6,67%) des isolats ont pu croître à des concentrations respectives de 0 et 8 % de NaCl ajoutées au milieu de culture PVK. En effet, pour des concentrations croissantes (0 à 8 % *p/v*) de NaCl, l'indice de solubilisation moyen des isolats bactériens a baissé significativement de 51,62 à 28,34 % contre 100,0 % dans le milieu Pikovkaya (PVK) normal (Figure 46). L'effet du chlorure de sodium sur la capacité des bactéries endophytes à solubiliser le phosphate tricalcique a varié d'un isolat à un autre. Car l'indice de solubilisation de la majorité des isolats bactériens a diminué fortement avec l'ajout du chlorure de sodium à différentes concentrations allant de 2 à 8 % dans le milieu de culture PVK. Cependant, l'absence du NaCl a aussi inhibé la majorité des isolats bactériens (Tableau XIX). Les isolats 42P, 38P, 58P, 7P et 30P n'ont pas été affectés par cette absence de NaCl. Au contraire cela a stimulé les isolats 7P et 30P. Ces isolats ont montré respectivement des indices de solubilisation de 122,5 et 133,34 % à une concentration de 0 % de NaCl contre des valeurs moyennes de 85,71 et 80 % dans le milieu PVK normal. Seulement trois isolats bactériens 42P, 58P et 3N ont pu solubiliser le phosphate tricalcique à la concentration de 8 % de NaCl.

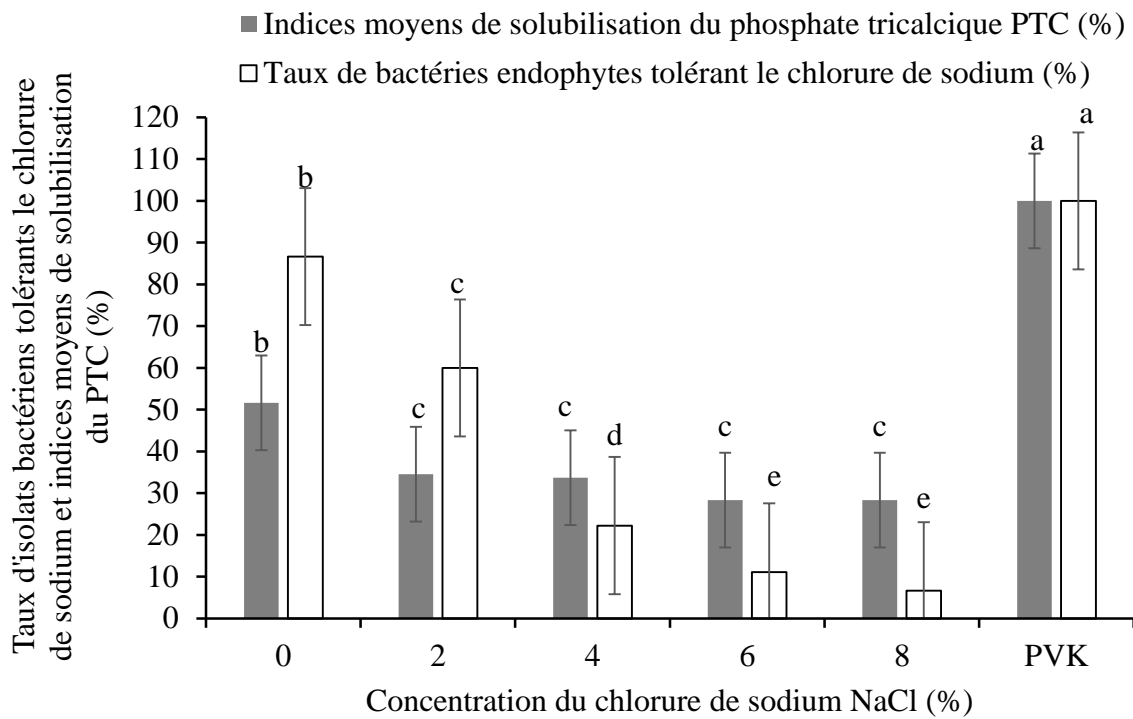


Figure 46 : Taux d'isolats bactériens tolérants et les indices moyens de solubilisation du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en fonction de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) ajoutées au milieu de culture PVK

Les barres surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman-Keuls au seuil de probabilité 5 %.

Tableau XIX : Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Indice de solubilisation du phosphate tricalcique (%)					
	Concentration (%) de NaCl dans le milieu PVK					
	PVK normal (0,02)	0	2	4	6	8
41P	200	12,5	12,5	0	0	0
53N	191	0	0	0	0	0
40P	185,71	25	20	16,67	0	0
5P	160	33,34	16,67	0	0	0
42P	150	120,5	75	45	30	25
38P	150	100	50	16,67	0	0
37P	150	85,72	37,5	33,34	16,67	0
4P	142,86	0	0	0	0	0
34P	128,57	83,34	80	10	10	0
31P	114,29	33,34	14,29	0	0	0
8P	114,29	25	0	0	0	0
3P	114,29	33,34	12,5	0	0	0
33N	100	37,5	25	0	0	0
31N	100	37,5	22,23	0	0	0
58P	100	100	85	66	60	50
47P	100	25	15,39	0	0	0
39P	100	87,5	25	16,67	0	0
33P	100	25	0	0	0	0
32P	100	75	62,5	12,5	0	0
6P	100	33,34	14,29	0	0	0
20P	100	37,5	28,58	0	0	0
21P	100	62,5	0	0	0	0
25P	100	50	0	0	0	0
1N	93,33	25	22,23	0	0	0
2P	92,31	71,43	20	0	0	0
35N	90,91	0	0	0	0	0
18P	87,5	50	0	0	0	0
35P	87,5	14,29	14,29	0	0	0
36P	87,5	57,15	0	0	0	0
3N	87,5	70	55	45	25	20
46P	87,5	16,67	25	0	0	0
61P	87,5	25	85,72	75	0	0
1P	85,71	0	0	0	0	0
7P	85,71	122,5	0	0	0	0
11P	85,71	0	0	0	0	0
16P	85,71	25	0	0	0	0
29P	85,71	5,27	0	0	0	0
55P	85,71	70,7	0	0	0	0
56P	85,71	33,34	14,29	0	0	0
41N	83,33	12,5	12,5	0	0	0
37N	81,82	114,29	66,67	0	0	0
30P	80	133,34	0	0	0	0
19P	75	16,67	14,29	0	0	0
22P	75	33,34	0	0	0	0
24P	75	25	0	0	0	0

7-1-5-4- Solubilisation du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sous stress acido-basique (pH)

La variation du pH vers des valeurs extrêmes a affecté la capacité des isolats à solubiliser le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Les pH très acides ont affecté considérablement la capacité solubilisatrice des bactéries endophytes du cacaoyer (Tableau XX). Cependant, les isolats ont montré une grande tolérance à la variation du pH. Les pH basiques ont affecté moins la capacité des isolats à solubiliser le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Plus on s'éloigne de la neutralité (pH=7,0) plus la capacité des isolats à solubiliser le phosphate diminue. Les isolats 31P, 32P, 37P, 40P, 42P, 46P, 47P, 55P, 58P et 41N ont supporté les pH extrêmes pH 3,5 et pH 10. Aucun isolat n'a pu se développer au pH égal à 3.

Tableau XX : Effet du pH sur la capacité solubilisatrice du phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les bactéries endophytes du cacaoyer

Isolats bactériens	Indice de solubilisation du phosphate tricalcique								
	pH								
	3	3,5	4,5	5,5	7,0	7,5	8	9	10
41P	0	81,82	100	111,12	200	100	81,82	54,55	30
53N	0	20	37,5	50	191	66,67	37,5	33,34	-
40P	0	63,64	81,82	90	185,71	122,23	83,34	75	70
5P	0	45,46	30	30	160	60	55,56	33,34	44,45
42P	0	66,67	70	75	150	100	100	90	90
38P	0	60	70	122,23	150	81,82	80	70	41,67
37P	0	63,64	112,5	133,34	150	150	81,82	63,64	50
4P	0	20	22,23	25	142,86	40	30	20	20
34P	0	80	100	108,34	128,57	90	88,89	66,67	36,37
31P	0	90	100	111,12	114,29	85,72	80	66,67	50
8P	0	50	30	30	114,29	75	55,56	37,5	16,67
3P	0	9,1	22,23	30	114,29	40	36,37	33,34	30
33N	0	10	41,67	55,56	100	80	50	41,67	40
31N	0	18,19	20	57,15	100	70	55,56	44,45	27,28
58P	0	81,82	88,89	100	100	130	100	81,82	80
47P	0	110	115,39	130	100	120	110	100	90
39P	0	54,55	60	81,82	100	90	88,89	60	45,46
33P	0	50	90	111,12	100	80	70	55,56	36,37
32P	0	0	30,77	41,67	100	100	88,89	63,64	60
6P	0	27,28	40	50	100	20	36,37	20	22,23
20P	0	12,5	50	70	100	77,78	50	40	33,34
21P	0	50	66,67	110	100	122,23	47,06	30	10
25P	0	20	66,67	100	100	171,43	88,89	42,86	42,86
1N	0	14,29	72,73	100	93,33	100	100	83,34	41,67
2P	0	0	15,39	21,43	92,31	30,77	30	23,08	16,67
35N	0	37,5	33,34	87,5	90,91	66,67	60	55,56	44,45
18P	0	12,5	44,45	40	87,5	85,72	70	35,72	33,34
35P	0	80	81,82	83,34	87,5	50	45,46	33,34	38,47
36P	0	0	44,45	75	87,5	70	50	45,46	40
3N	0	44,45	50	55,56	87,5	128,58	75	66,67	33,34
46P	0	63,64	74,29	80	87,5	80	80	80	70
61P	0	22,23	37,5	111,12	87,5	88,89	71,43	20	10
1P	0	18,19	20	40	85,71	41,67	25	14,29	0
7P	0	40	50	55,56	85,71	75	71,43	42,86	10
11P	0	7,7	50	60	85,71	75	40	37,5	20
16P	0	22,23	27,28	44,45	85,71	41,67	40	25	15,79
29P	0	50	80	100	85,71	57,15	70	40	10
55P	0	62,5	71,43	77,78	85,71	130	120	109,1	57,15
56P	0	0	33,34	142,86	85,71	85,72	57,15	33,34	25
41N	0	30	33,34	37,5	83,33	85,72	71,43	80	71,43
37N	0	100	100	100	81,82	100	100	83,34	44,45
30P	0	50	72,73	80	80	118,19	100	70	42,86
19P	0	40	40	50	75	66,67	33,34	30	20
22P	0	33,34	44,45	50	75	50	33,34	30	28,58
24P	0	66,67	133,34	140	75	120	114,29	50	42,86

7-1-6- Caractères biochimiques et culturaux des isolats

7-1-6-1- Production de la catalase

Le test de la catalase n'a concerné que 28 isolats à Gram positif (c'est-à-dire BG+). Ces 28 isolats en présence du peroxyde d'hydrogène ont provoqué une ébullition. Donc, ils possèdent tous une catalase (Catalase +).

7-1-6-2- Caractères culturaux sur gélose au cétrimide

Ce test n'a concerné que les bactéries à Gram négatif (BG-). Il a été obtenu sur la gélose au cétrimide avec l'ensemble des 17 souches à Gram négatif, des colonies circulaires, grisâtres, ayant une pigmentation jaune à vert fluor (Figure 47). Ces isolats ont l'aspect de colonies de *Pseudomonas* sp. sur la gélose au cétrimide.

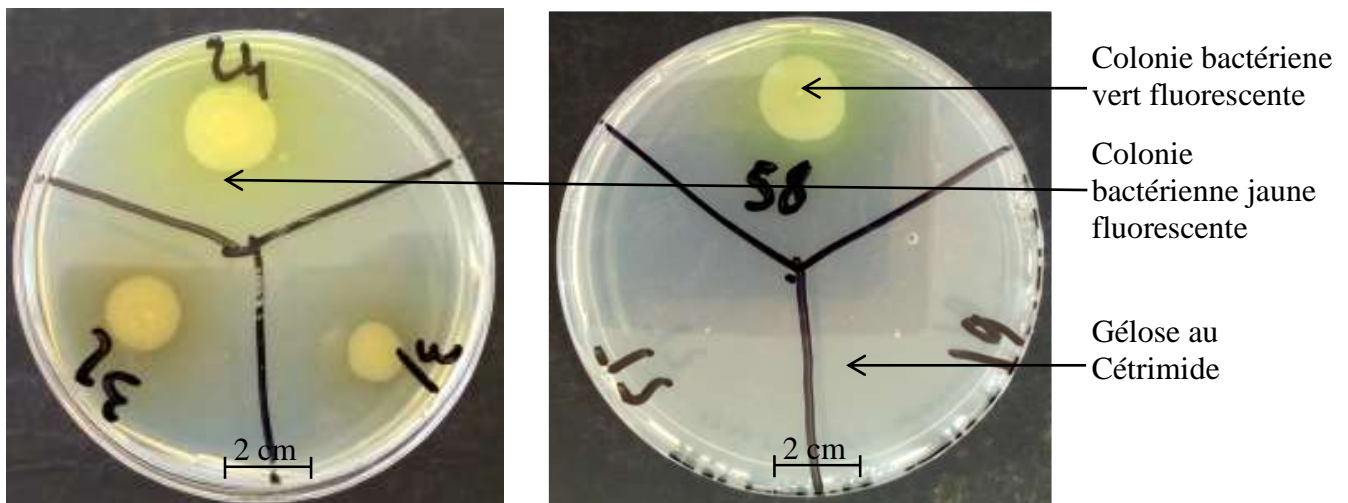


Figure 47 : Aspect des souches *Pseudomonas* sp. sur la gélose au cétrimide

(Photos : Ouattara Adama, 2019)

7-1-6-3- Caractères culturels sur milieux spécifiques aux Actinomycètes

Cette série de tests n'a concerné que les 28 isolats à Gram positif (BG+). Il s'agissait d'observer la croissance et le développement du mycélium aérien et la capacité de métabolisation de différents substrats sur différents milieux de culture : (ISP1, ISP2, ISP4, ISP9), le milieu « Synthetic Medium (SM) », le milieu Gause. Aucune des 28 isolats n'a produit un mycélium pendant 21 jours de cultures.

7-1-6-4- Caractères culturels sur gélose de Mossel

Ce test n'a concerné que les bactéries à Gram positif (BG+). Il a été obtenu avec l'ensemble des 28 isolats à Gram positif des colonies circulaires de couleur rose entourées d'un halo blanc sur la gélose de Mossel (Figure 48). Ces isolats ont l'aspect de colonies de *Bacillus* sp. sur la gélose de Mossel.

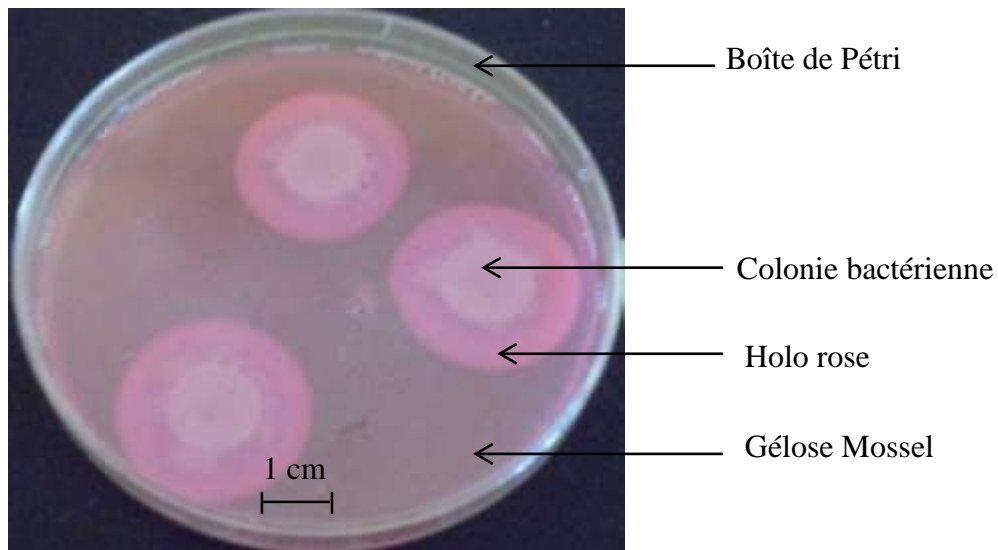


Figure 48 : Aspect des souches *Bacillus* sp. sur le milieu Mossel

(Photo : Ouattara Adama, 2019)

7-1-7- Identification préliminaires des isolats bactériens d'intérêt agronomique

L'ensemble des tests biochimiques et morphologiques réalisés ont permis de confirmer deux genres de bactéries endophytes (Annexe 6 ; Tableau XXI). Toutes les 17 bactéries soit 37,78 % à Gram négatif appartiennent au genre *Pseudomonas*, tandis que toutes les 28 bactéries soit 62,22 % à Gram positif sont du genre *Bacillus*.

7-2-Discussion

7-2-1- Isolement des bactéries endophytes

Cette étude a mis en évidence la présence des bactéries endophytes dans les principaux organes du cacaoyer : racines, tiges et feuilles. Ces bactéries endophytes présentes dans les tissus internes (racines et feuilles) des jeunes plants de cacaoyer n'ont provoqué ni infection ni d'effets négatifs sur leurs hôtes. À l'observation, les plants de cacaoyer n'ont présenté aucune pathologie apparente. Ces résultats confirment ceux obtenus par Konaté *et al.* (2015 b) qui ont isolé des bactéries endophytes à partir des racines et tiges de jeunes plants de cacaoyers. D'autres travaux antérieurs et récents ont aussi révélé la présence de bactéries endophytes dans les organes, feuilles, fleurs, racines, tiges, branches, cabosses et chérelles de cacaoyers après une stérilisation de surface (Melnick *et al.*, 2011 ; Zubir *et al.*, 2019 ; Giyanto *et al.*, 2020). Selon Santoyo *et al.* (2016), les bactéries endophytes résident dans différents tissus des plantes vivantes et sont omniprésentes chez les plantes monocotylédones et dicotylédones. Des bactéries endophytes ont été révélées chez diverses cultures (le riz, le blé, le maïs, la canne à sucre, la pomme de terre, le haricot, le soja, la carotte, les agrumes, le bananier et autres) (Aaraújo *et al.*, 2002 ; Mendes *et al.*, 2007 ; Ikeda *et al.*, 2013 ; Souza *et al.*, 2013 ; Yuan *et al.*, 2015 ; Chaudrhy *et al.*, 2017 ; Pei *et al.*, 2017 ; Padder *et al.*, 2017 ; Mashiane *et al.*, 2018).

La densité bactérienne au niveau des trois variétés (NA32, P7 et tout-venant) a varié de $7,46 \times 10^3$ à 36×10^3 UFC/g de racines fraîches et de $0,3 \times 10^3$ à $4,8 \times 10^3$ UFC/g de feuilles fraîches. Cette différence de densité bactérienne entre les feuilles et les racines est normale car les racines sont les premiers organes à être infectés et colonisés par les bactéries rhizosphériques. Des résultats similaires ont été rapportés par Konaté *et al.* (2015 b). Ces auteurs ont révélé une densité bactérienne de $4,8 \times 10^3$ à $3,8 \times 10^4$ UFC/g dans des racines fraîches du cacaoyer. Vega *et al.* (2005) ont rapporté que la densité des populations bactériennes endophytes varie d'une plante à une autre. Celle-ci a été généralement comprise entre $5,6 \times 10^3$ à $6,9 \times 10^5$ UFC/g de racines fraîches. Selon les travaux de Compant *et al.* (2005) un nombre élevé de bactéries endophytes associatives (10^3 à 10^7 cellules) peut coloniser le système vasculaire (phloème et xylème) d'une plante hôte. Leur densité importante dans les racines pouvant diminuer progressivement en allant vers les feuilles.

Les caractérisations morphologiques et biochimiques ont mis en exergue la coexistence chez les jeunes plants de cacaoyer, des bactéries endophytes Gram positif et Gram négatif. Une proportion plus élevée (83,03 %) de bactéries Gram positif contre 16,97 % de Gram négatif a été notée. Ce qui corrobore les résultats obtenus par Konaté *et al.* (2015 b) et ceux de Melnick *et al.* (2011). Ils ont signalé une prédominance de bacilles Gram positif au niveau des collections de bactéries endophytes isolées des racines et tiges de cacaoyers. Une prédominance de bactéries endophytes Gram positif a été également observée chez d'autres plantes telles que *Chlorophytum borivilum* (91,6 %) (Panchal & Ingle, 2011) et 68,9 % pour *Prosopis strombilifera* (Sgroy *et al.*, 2009). Par ailleurs, Miguel *et al.* (2013) ont obtenu un nombre supérieur de bactéries Gram positif à celui des bactéries Gram négatif au cours des premiers stades de développement des fruits de *Coffea canephora*. Contrairement, des études ont signalé une prédominance de bactéries endophytes Gram négatif chez d'autres plantes tel que le cactus (Lopez *et al.*, 2011). Toutefois, des études ont trouvé des proportions égales de bactéries endophytes Gram positives et des bactéries Gram négatif dans les racines de différentes cultures (Vetrivelkai *et al.*, 2010). Cette variation des pourcentages de bactéries endophytes Gram positif ou Gram négatif pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes d'actions qui régulent la communauté microbienne endophytes des racines. Des facteurs abiotiques comme le pH, la température, les métaux lourds et les résidus de pesticides peuvent intervenir dans cette sélection. Des facteurs génétiques peuvent aussi déterminer les bactéries aptes à coloniser la plante. De même, des facteurs intrinsèques aux communautés microbiennes déterminent aussi leur capacité à survivent dans les tissus racinaires (Jonathan *et al.*, 2013).

7-2-2- Caractères biochimiques des isolats bactériens d'intérêt agronomique

Tous les isolats testés ont été capables de se développer sur un milieu pauvre en azote. Des résultats similaires ont été obtenus par Rai (2017). En effet, il a isolé 69 bactéries du sol sur un milieu pauvre en azote. L'azote moléculaire constitue 78 % des gaz de l'atmosphère. C'est un élément chimiquement stable et inassimilable par les organismes supérieurs ainsi que la majorité des microorganismes (Rai & Nabti, 2017). Cependant, certains microorganismes sont capables d'assurer la fixation de l'azote atmosphérique, participant au cycle biogéochimique de l'azote (Golubyatnikov *et al.*, 2013 ; Gupta *et al.*, 2015).

Selon Reddy (2014) la fixation biologique de l'azote dans le sol est l'un des mécanismes à travers lesquels les microorganismes stimulent la croissance des plantes (Gray & Smith, 2005).

Ce processus est principalement utilisé par des microorganismes procaryotes menant une vie libre (*Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Acetobacter* etc.) ou vivants en symbiose avec les plantes (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* etc.). La fixation de l'azote est assurée par une enzyme appelée la nitrogénase (Zehr *et al.*, 2003).

L'application des bactéries fixatrices d'azote pour minimiser l'utilisation accrue des fertilisants chimiques est largement adoptée en céréaliculture. Ainsi, les bactéries appartenant aux genres *Azospirillum* (Nabti *et al.*, 2010 ; Volpiano *et al.*, 2014), *Pseudomonas* (Mirza *et al.*, 2006), *Bacillus* (Park *et al.*, 2005), *Herbaspirillum* (Volpiano *et al.*, 2014 ; Brusamarello-Santos *et al.*, 2012), *Azotobacter* (Milošević *et al.*, 2012 a), *Rhizobium* et *Enterobacter* (Habibi *et al.*, 2014), *Klebsiella* (Iniguez *et al.*, 2004) et *Burkholderia* (Govindarajan *et al.*, 2008) ont montré une grande efficacité comme substituants (ou suppléments) pour minimiser l'application des fertilisants chimiques et augmenter le rendement des plantes comme le blé, le soja et le riz.

Les tests *in vitro* ont révélé 90 isolats sur 218 (41,28 %) capables de solubiliser le phosphate tricalcique. Ces bactéries endophytes du cacaoyer ont été capables de produire des enzymes phosphatases. Ces enzymes sont capables de minéraliser le phosphate tricalcique insoluble en formes solubles ou ions orthophosphates H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} assimilables par la plante (Pierzynski *et al.*, 2005 ; Oteino *et al.*, 2015). Selon plusieurs auteurs, la solubilisation du phosphate inorganique par les microorganismes se produit aussi par la production d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide aspartique (Sharma *et al.*, 2013 ; Baliah *et al.*, 2016). Ainsi, les isolats entourés d'un halo transparent sur le milieu PVK sont donc susceptibles de produire des acides organiques pour minéraliser le phosphate tricalcique.

Cependant ce critère de sélection n'est pas infaillible. Car certaines bactéries ne présentent de halo en milieu solide mais sont capables de solubiliser le phosphate tricalcique en milieu liquide (Nautiyal *et al.*, 2000). Cela peut s'expliquer par la faible diffusion dans le milieu solide, des acides produits par ces bactéries au cours de leurs croissances (Amadou, 2003).

Par ailleurs, les indices de solubilisation du phosphate tricalcique des isolats bactériens ont varié d'un sol à un autre.

Les bactéries solubilisant le phosphate provenant des localités de Duékoué et de Soubré ont présenté les indices moyens les plus élevés contrairement aux isolats issus des autres localités (Daloa, Divo, Aboisso et Abengourou).

Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Amadou (2003). En effet, il a isolé des bactéries solubilisant le phosphate naturel à partir de trois types de sols au Mali et dont les indices de solubilisation du phosphate naturel variaient d'un sol à un autre. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les microorganismes présents dans un sol pauvre en phosphate soluble fournissent plus d'énergie pour minéraliser les réserves de phosphates insolubles (Pierzynski *et al.*, 2005). Par conséquent, ces microorganismes sont dotés d'un système enzymatique plus performant que celui d'autres microorganismes présents dans un sol riche en phosphore soluble.

Selon les travaux de Baliah *et al.* (2016), la densité de bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate varie d'un sol à un autre. Cette variation pourrait être liée à différents facteurs abiotiques du sol. Kucey (1983) a montré aussi que des bactéries solubilisant le phosphate ont été isolées de la plupart des sols testés, mais leur densité était conditionnée par la nature du sol, les conditions climatiques et l'histoire culturale des parcelles. Yadav & Singh (1991), explique cette différence par la différence de teneur en carbone organique des différents sols. Liu *et al.* (2011) ont suggéré que la densité des phosphobactéries pourrait être liée aux propriétés physiques et chimiques du sol, à la teneur en matière organique, aux types de fertilisants appliqués et aux pratiques culturales.

De même, l'étude de Kassin *et al.* (2014) a montré que les sols de la localité de Duékoué sont plus pauvres en phosphate soluble que les sols des localités de Soubré, Divo, Aboisso et Abengourou qui sont riches en phosphore.

Il n'y a eu aucune différence entre les indices de solubilisation des isolats bactériens issus des différentes variétés et des différents organes des plants de cacaoyer. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le phosphore soluble est utilisé dans les processus biologiques une fois assimilé par la plante.

Dans la littérature, aucune étude *in vitro* n'a été encore menée sur les bactéries endophytes du cacaoyer solubilisant le phosphate tricalcique. Cependant, des bactéries endophytes isolées des racines et tiges du caroubier (*Ceratonia siliqua*) ont montré une activité similaire de solubilisation du phosphate tricalcique (Konaté *et al.*, 2014 b).

Plusieurs espèces de bactéries rhizosphériques, de champignons mycorhiziens, d'Actinomycètes et d'algues ont également été signalées pour exercer une activité de solubilisation *in vitro* de phosphate tricalcique (Sharma *et al.*, 2013).

Les bactéries capables de solubiliser le phosphate insoluble pourraient être des agents potentiels intéressants pour la biofertilisation du cacaoyer. De plus, dans la littérature ces bactéries solubilisant le phosphate encore appelées bactéries phosphatées sont citées comme une solution écologique durable dans la fertilisation des plantes (Karpagam & Nagalakshmi, 2014).

La solubilisation du mica réalisée *in vitro* a révélé 189 isolats bactériens (soit 89 %) capables de solubiliser le mica. Ces isolats ont présenté un halo blanc ou rose autour des colonies sur le milieu Aleksandrov modifié solide (Aleksandrov *et al.*, 1967). Cela montre que ces bactéries endophytes du cacaoyer ont produit des enzymes pour minéraliser le mica en potassium soluble. De nombreuses études de recherches ont montré que certaines bactéries rhizosphériques peuvent dissoudre les roches potassiques telles que le mica, la biotite, la muscovite, le feldspath, la microcline et l'orthoclase en potassium soluble grâce à la production d'acides organique tels que l'acide citrique, l'acide gluconique (Parmar & Sindhu, 2013 ; Meena *et al.*, 2015 ; Mursyida *et al.*, 2015 ; Bakhshandeh *et al.*, 2017 ; Rajawat *et al.*, 2019).

Les isolats ont différemment solubilisé le mica selon la provenance des sols. Les isolats provenant des sols collectés dans la localité de Daloa ont montré des indices les plus élevés. Cette différence pourrait s'expliquer par une différence d'âge entre les parcelles d'échantillonnage. Car dans les localités de Daloa, les plantations sont généralement vieilles d'au moins 20 ans. Dans ces plantations non entretenues, il n'y a pas eu d'apport récent de fertilisant chimiques contrairement aux sols collectés dans les régions de Duékoué, Soubré et Divo où les plantations sont encore jeunes et souvent bien suivies (Ruf *et al.*, 2014). Kassin *et al.* (2014) ont montré que la plupart des sols situés en zone forestière en Côte d'Ivoire sont pauvres en potassium soluble assimilable par les plantes. D'où un apport exigé de fertilisants chimiques.

Des résultats similaires ont été obtenus par Dong *et al.* (2019). Ils ont isolé des bactéries solubilisant le potassium à partir de trois sols différents de la même région dont un sol de zone forestière, un sol fertilisé sous plantation d'hévéa et un sol agricole nu fertilisé. Leur étude a montré que le taux de bactérie solubilisant le potassium était plus élevé dans le sol prélevé en zone forestière que les deux autres sols agricoles.

Ainsi, la nature du sol, l'apport de fertilisant chimique et les pratiques culturales ont un impact négatif sur la communauté microbienne du sol. Il a été aussi rapporté que les propriétés physiques et chimiques du sol ont une influence significative sur la population bactérienne du sol (Zhang & Kong, 2014).

Par ailleurs, la nature de l'organe végétatif et la variété de cacaoyer à partir desquelles les bactéries ont été isolées, ont significativement influencé la capacité des isolats à solubiliser le mica. Le potassium est en réalité impliqué dans de nombreux processus biochimiques et physiologiques chez les plantes. Comme la régulation stomatique (l'ouverture et la fermeture des stomates) qui dépend du potassium K^+ (Maqsood *et al.* 2013 ; Rajawat *et al.*, 2019). Le potassium joue également un rôle majeur dans le transport de l'eau et des nutriments dans la plante par le xylème. Cela prouve donc que la quantité de potassium présent dans les organes de la plante varie constamment. Entraînant ainsi un besoin constant chez la plante à tout stade de son développement. Ainsi, une fois entré dans la plante par la racine le potassium transite par la tige pour atteindre la feuille où il entre dans de nombreux processus biochimiques et physiques de la plante, donc rapidement éliminé. Diverses études ont été réalisées sur les bactéries solubilisant le potassium et ces études ont montré que celles-ci pourraient améliorer significativement le rendement des cultures, en comparaison avec les engrais chimiques (Sangeeth *et al.*, 2012 ; Tin *et al.*, 2013 ; Prajapati & Modi, 2012).

L'évaluation de la capacité de l'ensemble des isolats à hydrolyser l'amidon a permis de mettre en évidence 44 isolats capables de produire de l'amylase sur 45 isolats testés (soit 97,77 %). Des résultats similaires ont été observés par Baghya *et al.* (2019) avec les bactéries endophytes isolées des nodules de *Vigna radiata* L. L'amylase est une enzyme de grande importance en biotechnologie (Rajagopalan & Krishan, 2008). La synthèse d'enzymes amylolytiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique et fournit les éléments minéraux nécessaires pour la croissance des plantes (Obi & Odibo, 1984). Au cours de ces dernières décennies des recherches considérables ont été entreprises sur les amylases produites par diverses microorganismes (Gupta *et al.*, 2003). Particulièrement, les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* qui sont connus pour produire les enzymes extracellulaires (lipase, estérase, xylanase, pectinase, amylase, protéase et cellulase) dégradant la matière organique (Allaire, 2005). Les amylases produites par le genre *Bacillus* sont largement répandues dans les procédés industriels de biotransformation de l'amidon en raison de leur thermo-stabilité (Maktouf, 2013).

La majorité des isolats bactériens endophytes du cacaoyer a été inhibée à la concentration 10 % du nitrate de potassium ajoutée au milieu de culture. Cela pourrait supposer que sur l'ensemble des souches testées, seulement 12 ont été capables de produire une enzyme hydrolysant le KNO_3 . Par ailleurs, seulement 3 isolats bactériens ont pu tolérer le nitrite de sodium à la dose de 0,5 % (p/v). En effet, le nitrate de potassium et le nitrite de sodium (NaNO_2) sont toxiques pour la plupart des bactéries (Sofos *et al.*, 1995 ; Davidson, 2002 ; Banas & Latas, 2006). Missbah *et al.* (1996) testant des bactéries endophytes du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) ont obtenu des résultats similaires à une concentration de 8 % de KNO_3 . Les bactéries endophytes du cacaoyer pourraient donc réduire partiellement ou totalement les ions nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-) en azote moléculaire (N_2) par la production d'enzymes nitrate réductases et nitrite réductases. Les isolats qui ont toléré uniquement les plus faibles concentrations de nitrate de potassium (0 à 4 %) n'ont probablement pas de système enzymatique de dénitrification complet pour réduire le nitrate et le nitrite en azote moléculaire. Cependant, ceux qui ont pu tolérer les doses respectives de 10 % et 0,5 % de nitrate de potassium et de nitrite de sodium pourraient avoir la capacité de produire toutes les enzymes intervenant dans la chaîne de dénitrification du nitrate et du nitrite. Car la dénitrification microbienne transforme les nitrates en azote gazeux et comporte plusieurs intermédiaires dont les ions nitrites (NO_2^-) et oxydes nitreux (NO). Seules les bactéries dénitrifiantes dotées d'un système enzymatique complet peuvent synthétiser la chaîne enzymatique complète menant à l'azote (Philippot *et al.*, 2007 ; Berton *et al.*, 2013).

7-2-3- Caractérisation physiologique

Les isolats ont montré une tolérance à la salinité (NaCl). Quatre (4) isolats (46P, 47P, 61Pet 1N) sur 45 (soit 8,89 %) ont montré une grande osmotolérance. Car ils ont toléré le NaCl jusqu'à la concentration de 10 % (p/v). Des résultats similaires ont été obtenus par Konaté *et al.* (2015 b). Ils ont montré que des bactéries endophytes isolées des racines et tiges du cacaoyer avaient toléré le NaCl jusqu'à la concentration de 9 %. De même Konaté *et al.* (2014 a) ont aussi observé pareille osmotolérance chez les bactéries endophytes du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.).

Par ailleurs, selon Reva *et al.* (2002), les endophytes bactériens du cotonnier ont eu une croissance optimale en présence d'une dose de 10 % de NaCl. Les endophytes symbiotiques et associatives peuvent tolérer la salinité élevée, que ce soit en culture (El Sheikh & Wood, 1990) ou dans le sol (Tilak *et al.*, 2005).

Cette remarquable osmotolérance constatée chez les isolats bactériens étudiés semble être liée avec leur capacité à accumuler des solutés compatibles osmoprotectants (Tilak *et al.*, 2005).

Les résultats de cette étude ont montré que l'urée a été toxique pour tous les isolats à la dose de 4 % (p/v). Par contre le NPK a été supporté jusqu'à la concentration de 10 % (p/v). Seulement cinq isolats sur 45 soit (11,11 %) ont pu tolérer l'urée à la concentration de 2% (p/v). Des résultats similaires ont été obtenus dans plusieurs études de fertilisation au champ. En effet, selon Geisseler et Scow, (2014) et Luo *et al.*, (2015), l'urée et l'ammonium réduiraient le pH du sol et cette baisse du pH entraînerait l'acidification du milieu qui devenait toxique pour les microorganismes du sol. De même Ai *et al.* (2012) ont également remarqué que les fertilisants azotés affectaient plus la survie des bactéries Gram positif par rapport aux bactéries Gram négatif. Or, dans la présente étude la majorité des isolats ont été de Gram positif. Par ailleurs, les études de Lupwayi *et al.* (2011 ; 2012) ont montré que l'application de l'urée à la dose de 90 kg N.ha⁻¹ n'avait aucun effet nocif significatif sur la biomasse et la diversité microbienne du sol. Cependant, l'application de l'urée à une dose de 120 kg N.ha⁻¹ semble entraîner une baisse significative de la biomasse et de la diversité bactérienne du sol. Ce même constat a été fait par Luo *et al.* (2015) qui ont montré que l'application de l'urée affectait plus la biomasse et la diversité bactérienne du sol que lorsque l'engrais NPK était appliqué.

Cette étude a montré que tous les isolats bactériens du cacaoyer ont été sensibles au pH très acide. Aucun isolat n'a toléré le pH égal à 3,00. Cependant, 86, 67 % des isolats ont montré un caractère acido-tolérant au pH égal à 3,5. De plus, tous les isolats ont toléré les pH basiques allant de 7,5 à 10. Des résultats similaires ont été obtenus par Konaté *et al.* (2015 b) avec des endophytes bactériens de cacaoyer. Selon leur étude, 89 % des isolats ont toléré les pH allant de 7 à 10. Par ailleurs, Konaté *et al.* (2014 a) ont observé une tolérance similaire chez les bactéries endophytes du caroubier (*Ceratonia siliqua* L). En effet, Ils ont observé chez les endophytes bactériens du caroubier une tolérance de 60 à 100 % sur une plage de pH allant de 4 à 10. Cependant, aucune de ces souches n'avait supporté le pH égal à 3. Cette tolérance de la plupart des isolats du cacaoyer vis-à-vis du pH est en parfait accord avec les travaux de Döbereiner *et al.* (1976), de Nautiyal *et al.* (2000) et de Reva *et al.* (2002). Ils ont montré que les bactéries associatives sont généralement des neutrophiles et des basophiles. Toutefois, certaines espèces endophytes telle que *Gluconoacetobacter diazotrophicus* ont montré une croissance optimale à pH égal à 5,5 mais aussi ont montré la faculté de croître à pH égal à 3 et de fixer l'azote à pH égal à 2,5 (Gillis *et al.*, 1989).

Cette étude a montré que la présence de métaux lourds dans le milieu de culture a un effet inhibiteur plus ou moins prononcé sur la capacité des bactéries endophytes à solubiliser le phosphate tricalcique. Cette capacité varie d'un isolat à un autre, mais aussi en fonction des métaux lourds et de leurs concentrations dans le milieu de culture.

Certains métaux lourds (Cu, Co, Zn, Cd) ont été beaucoup plus toxiques pour les bactéries que d'autres (Al, Pb). Ils ont inhibé non seulement la croissance des bactéries mais aussi leur capacité à solubiliser le phosphate tricalcique aux concentrations allant de 0,5 à 50 µg / ml. L'ordre de toxicité décroissante des métaux lourds vis-à-vis des isolats a été : Zn > Cu > Co > Cd > Al > Pb. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Paul et Sinha (2015), et de Andriamafana *et al.* (2018) qui ont montré que les métaux lourds (Cd, Cr, Pb, Zn) utilisés à différentes concentrations agissaient la survie et la capacité des différentes bactéries à solubiliser le phosphate. Certains isolats ont toléré les concentrations élevées de métaux lourds et ont pu solubiliser le phosphate tricalcique. Cependant, la capacité des isolats à solubiliser le phosphate tricalcique a baissé au fur et à mesure que la concentration en métaux lourds a augmenté. Ces résultats corroborent ceux de Paul et Sinha (2015) qui ont montré que la plupart des bactéries solubilisant le phosphore se développe à de faibles concentrations de métaux lourds. Aussi, leur nombre diminue progressivement à mesure que la concentration augmente. Les microorganismes tolérants aux métaux lourds pourraient jouer un rôle important dans la biorestauration des environnements contaminés par ces métaux (Sun *et al.*, 2010 ; Sinha *et al.*, 2011 ; Sinha & Paul, 2014). La variation de la toxicité des métaux lourds vis-à-vis des isolats bactériens pourrait s'expliquer par les caractéristiques physiologiques des isolats bactériens (Hassan *et al.*, 2008).

Les travaux de Gusmão-Lima *et al.* (2005) ont rapporté que les métaux lourds présents dans le sol pourraient entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire des rhizobactéries. De nombreux travaux montrent des mécanismes par lesquels les bactéries résistent aux métaux lourds (Silver & Phung, 2005 ; Carip *et al.*, 2008 ; Khan *et al.* 2010 ; Milošević *et al.*, 2012 b). En effet, les bactéries solubilisant le phosphore pourraient chélater plusieurs métaux lourds tels que l'arsenic, le cadmium, le chrome, le cuivre, le plomb, le nickel et le zinc avec des affinités variables (Schalk *et al.*, 2011).

Cette étude a aussi montré qu'une augmentation de la salinité dans le milieu de culture entraînait la baisse de la capacité des bactéries endophytes du cacaoyer à solubiliser le phosphate tricalcique.

Les résultats obtenus ont confirmé ceux de Srividya *et al.* (2009) et de Marasco *et al.* (2013). En effet, ils ont rapporté que l'aptitude des microorganismes à solubiliser le phosphate diminue à mesure que la concentration en NaCl augmente. Cela induirait une réduction de la croissance et un ralentissement de la prolifération cellulaire sous des contraintes salines. Un trop grand nombre d'ions chlorure peuvent chélater et neutraliser les protons ou l'acide du milieu.

Entraînant ainsi une inefficacité de solubilisation (Srividya *et al.*, 2009). Toutefois, certaines bactéries ont été capables de solubiliser le phosphate tricalcique en présence de fortes teneurs en NaCl (10%). Des résultats similaires rapportés par Konaté *et al.* (2015b), ont montré que les bactéries endophytes du cacaoyer pourraient tolérer un taux élevé de NaCl à 9 %. Les travaux de El-Hilali (2006) et Nautiyal *et al.* (2000), ont également montré une halotolérance chez quatre bactéries symbiotiques du lupin (*Lupinus luteus*). Celles-ci ont été capables de solubiliser le phosphate tricalcique à une concentration de 10 % de NaCl et à un pH égal à 12 et à une température de 45°C. Les travaux de Yang *et al.* (2009) révèlent que les rhizobactéries isolées des sols salins ont été capables de croître à différents niveaux de salinité. Ainsi, l'inoculation des souches de rhizobactéries promotrices à des plantes stressées atténuerait le stress salin (Ashraf *et al.*, 2008 ; Saharan & Nehra, 2011). Joe *et al.* (2016) ont identifié dans une étude des souches d'endophytes bactériens osmotolérantes et capables de solubiliser le phosphate tricalcique inorganique sous stress salin. Ces souches bactériennes appartenaient aux genres *Acinetobacter* sp., et *Bacillus* sp., isolées de *Phyllanthus amarus*.

Les résultats de ces travaux ont par ailleurs rapporté que les bactéries endophytes du cacaoyer ont une bonne tolérance aux pH de 4,5 à 10. Cependant, l'activité de solubilisation baisse fortement avec l'augmentation ou la baisse du pH. Le maximum d'activité de solubilisation est réalisé à pH égal à 7,5. Ces résultats corroborent ceux d'Adejumo et Orole (2010) qui ont constaté également que les bactéries endophytes du maïs ont toléré parfaitement des pH de 4 à 11. D'autres études ont révélé que certaines bactéries Actinomycètes des sols désertiques supportent des pH variant de 3,8 à 11 (Singh & Jha, 2015). Les travaux de Rai & Nabti (2017) ont montré que la croissance des souches bactériennes est meilleure sur une gamme de pH allant de 6.5 à 8, avec un optimum aux alentours de la neutralité (pH égal à 7). Cela justifierait aisément la forte activité de solubilisation à pH égal à 5 au cours de ces travaux. Cette forte activité est due à une bonne prolifération des bactéries à pH neutre. Toutefois, les travaux de Nautiyal *et al.* (2000) et de Abd-Alla (1994) ont

montré que les stress abiotiques (salinité et pH) pouvaient induire la solubilisation du phosphate tricalcique.

7-2-4- Caractères biochimiques et culturels des isolats bactériens d'intérêt agronomique

La majorité des isolats ont réagi positivement au test de catalase. Cela indique donc qu'ils peuvent produire la catalase. Des résultats similaires ont été obtenus par Baghya *et al.* (2019) et Son *et al.* (2006) qui ont mené des études d'isolement, d'identification et de criblage de bactéries endophytes de différentes plantes. La catalase est une enzyme qui aide les cellules bactériennes à éviter la toxicité cellulaire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Sur les 45 isolats testés, 28 bactéries à Gram positif ont réagi positivement au test de la catalase. Il n'y a donc pas d'anaérobies stricts parmi ces bactéries. Aucune des 28 souches n'a produit un mycélium sur un milieu spécifique aux bactéries du genre *Actinomyces*. Ces bactéries ne seraient pas des *Actinomyces* sp., producteurs de mycélium. En revanche, elles ont donné des colonies circulaires de couleur rose et entourées d'un halo blanc sur la gélose de Mossel. Ces isolats ont donné l'aspect de *Bacillus* sp. sur la Gélose de Mossel. Ainsi, ces bactéries ont été identifiées comme étant du genre *Bacillus*. Les *Bacillus* sp. sont capables de produire des antibiotiques, donc sollicités dans le biocontrôle des maladies de nombreuses plantes. Dix-sept (17) isolats à Gram négatif ont donné des colonies grisâtres ayant une pigmentation jaune à vert fluor sur le milieu Cétrimide agar. Ces isolats ont été identifiés comme étant du genre *Pseudomonas* sp. Ainsi, les quarante-cinq (45) isolats bactériens d'intérêt agricole isolés des organes du cacaoyer seraient composés de 28 *Bacillus* et 17 *Pseudomonas*. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés sur des cultures. En effet, plusieurs auteurs ont identifié *Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp., comme les espèces prédominantes de bactéries endophytes associées à différentes plantes hôtes cultivées (Melnick *et al.*, 2011; Prasad & Dagar, 2014). Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. peuvent cohabiter et coloniser la rhizosphère et les divers organes du cacaoyer (Melnick *et al.*, 2011; Falcão *et al.*, 2014; Konaté *et al.*, 2015 b ; Zubir *et al.*, 2019).

7-3- Conclusion partielle

Cette étude a permis de mettre en exergue la présence de bactéries endophytes dans les organes principaux (racines, tiges et feuilles) des trois variétés de cacaoyers utilisées. Au total deux cent dix-huit (218) bactéries endophytes ont été isolées avec une prédominance de bacilles Gram positifs. L'étude phénotypique (morphologique et biochimique) a permis de sélectionner 45 isolats d'intérêt agronomique appartenant à deux genres (*Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp.) avec une prédominance du genre *Bacillus* sp.

La caractérisation physiologique a permis d'évaluer la tolérance des isolats d'intérêt agronomique par rapport à de principaux stress abiotiques tels que la salinité, le pH, les métaux lourds, les engrais azotés (NPK, KNO₃, urée, NaNO₂). Les stress salin, acido-basique ou les métaux lourds dans le milieu de culture ont eu un effet inhibiteur plus ou moins prononcé sur la capacité des bactéries endophytes à solubiliser le phosphate tricalcique. Cette capacité a varié d'un isolat à un autre mais aussi en fonction des métaux lourds ainsi que de leurs concentrations dans le milieu de culture. Certains métaux lourds comme le cuivre, le cobalt, le zinc et le cadmium ont été beaucoup plus toxiques pour les bactéries par rapport à l'aluminium et le plomb. Ces endophytes ont pu croître dans des milieux ayant un pH allant de 3,5 à 10. L'osmotolérance s'est révélée importante pouvant aller jusqu'à 10 % de NaCl. Ces isolats bactériens ont aussi montré une bonne tolérance aux engrais azotés (NPK et KNO₃). Cependant, une sensibilité bien marquée a été observée avec l'urée et le nitrite de sodium. Ces isolats ont montré une bonne capacité à solubiliser le phosphate tricalcique sous différents stress abiotiques tels que la salinité, les métaux lourds et le pH. Deux isolats 37N et 21P, ont été révélés multi-résistants aux métaux lourds. Ces bactéries endophytes pourraient jouer un rôle important dans la biofertilisation et la biorestauration des sols en Côte d'Ivoire et contribuer aussi au développement durable de la cacaoculture ivoirienne.

Chapitre 8 : Évaluation de l'efficacité des bactéries endophytes antagonistes des deux espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses

8-1-Résultats

8-1-1- Tests d'antagonisme *in vitro* des bactéries endophytes contre les espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*

8-1-1-1- Tests d'antagonisme *in vitro* des bactéries endophytes contre l'espèce *Phytophthora palmivora*

Les tests de confrontation *in vitro* ont été réalisés sur une période maximale de 30 jours pour chaque isolat. Au bout de 30 jours de confrontation, le diamètre moyen des colonies de *Phytophthora palmivora* en présence des bactéries endophytes a été réduit. Les taux d'inhibition de *Phytophthora palmivora* par les bactéries endophytes testées, ont varié de 28,58 à 70,54 %. Les isolats 48P, 18N, 42P, 60P, 47P et 23P ont inhibé la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* avec respectivement des taux d'inhibition de 70,54 à 62,20 % soit des diamètres moyens respectifs de 24,75 à 31,75 mm du mycélium. Une analyse de la variance (ANOVA) portant sur les taux d'inhibition de la croissance mycélienne du *Phytophthora palmivora* a révélé une différence significative ($p < 0,0001$) entre les isolats bactériens. Par ailleurs, le test de comparaison multiple de Student Newman-Keuls au seuil 5 % a révélé plusieurs groupes homogènes d'isolats bactériens selon leurs effets d'inhibition sur *Phytophthora palmivora* (Tableau XXII).

Dans l'ensemble, trois catégories de bactéries endophytes ont été enregistrées selon leurs effets inhibiteurs au bout de 30 jours de confrontation avec la souche de *Phytophthora palmivora*.

- La première catégorie de bactérie a été caractérisée par des isolats qui ont manifesté un effet inhibiteur fort sur *Phytophthora palmivora*. Pour ces bactéries, les taux d'inhibition ont varié de 70,54 à 57,15 % au bout de 30 jours. Deux types de bactéries ont été observés au sein de cette catégorie selon la rapidité d'apparition et la durée de maintien de leur effet d'inhibition sur la croissance mycélienne du pathogène. Le premier type comprend des bactéries qui ont retardé la croissance du pathogène dès la première semaine de confrontation. Ce sont les isolats 48P, 60P, 32P, 1N, 2N et TG27. Cependant, à partir de la deuxième semaine le pathogène a repris sa

croissance normale pour les isolats 32P, 1N, 2N et TG27. Le deuxième type a été représenté par des isolats bactériens ayant manifesté une réduction du mycélium qui a commencé à partir du 6^{ème} jour pour certains tels que les isolats 18N et 23P et à partir du 10^{ème} jour pour d'autres tels que les isolats 14P, 42N, 47P et 11P.

La deuxième catégorie a été caractérisée par les isolats bactériens ayant eu des taux d'inhibition faibles compris entre 47 et 57 %, ces isolats ont manifesté un effet fongistatique simple. Car une fois le mycélium a atteint la ligne de la bactérie il n'a plus évolué mais aussi n'a pas été réduit.

La troisième catégorie a été caractérisée par les isolats qui ont manifesté un effet d'inhibition très faible ou pratiquement négligeable, car le mycélium a traversé la ligne de la bactérie et les taux d'inhibition ont varié entre 28,58 et 46,43 %.

Tableau XXII : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de *Phytophthora palmivora* BL7.11.2 après 30 jours de confrontation

N°	Isolats bactériens	Diamètres moyens du mycélium ±Ecart-type (mm)	Taux moyens d'inhibition ±Ecart-type (%)	Taux d'inhibition en valeurs transformées *
1	48P	24,75±1,79	70,54±4.28	0,7875 ^a
2	18N	28,25±0,62	66,37±1.49	0,7275 ^b
3	42P	30,25±1.70	63,99±2.03	0,6975 ^{bc}
4	60P	30,50±0.57	63,69±0.68	0,695 ^{bcd}
5	47P	31,25±0.95	62,80±1.13	0,6825 ^{bcde}
6	23P	31,75±1.25	62,20±1.49	0,6750 ^{bcdef}
7	11P	34,00±1,00	59,53±2.38	0,6450 ^{cdefg}
8	40P	34,00±2.44	59,53±2.91	0,6425 ^{cdefgh}
9	14P	34,00±1,47	59,53±3.50	0,6425 ^{cdefgh}
10	20N	34,50±4.50	58,93±5.35	0,6350 ^{cdefghi}
11	42N	34,75±1.73	58,63±2.06	0,6350 ^{cdefghi}
12	1N	35,00±2.82	58,34±3.36	0,6300 ^{cdefghij}
13	71P	35,00±2.30	58,34±2.74	0,6300 ^{cdefghij}
14	17P	35,00±0,91	58,34±2.17	0,6275 ^{cdefghijk}
15	50N	35,00±3.36	58,34±4.00	0,6275 ^{cdefghijk}
16	22N	35,00±1.15	58,34±1.37	0,6250 ^{cdefghijk}
17	35N	35,50±1.73	57,74±2.06	0,6200 ^{cdefghijk}
18	41N	35,75±2.75	57,44±0,00	0,6175 ^{cdefghijk}
19	43N	35,75±2.75	57,44±3.27	0,6175 ^{cdefghijk}
20	14N	35,75±2,28	57,44±5.44	0,6175 ^{cdefghijk}
21	65P	36,00±2.58	57,15±3.07	0,6150 ^{cdefghijk}
22	TG27	36,00±2.94	57,15±3.50	0,6125 ^{cdefghijkl}
23	52N	36,00±2.16	57,15±2.57	0,6125 ^{cdefghijkl}
24	66P	36,25±1.70	56,85±2.03	0,6075 ^{defghijklm}
25	46P	36,50±0.57	56,55±0.68	0,6050 ^{efghijklmn}
26	17N	36,75±1,10	56,25±2.63	0,6000 ^{efghijklmn}
27	64P	36,75±0.95	56,25±1.13	0,6000 ^{efghijklmn}
28	29N	37,00±1.41	55,96±1.68	0,5975 ^{efghijklmn}
29	21N	37,25±1.70	55,66±2.03	0,5950 ^{efghijklmn}
30	35P	37,25±2.08	55,66±2.47	0,5925 ^{efghijklmno}
31	26N	37,50±2.21	55,36±2.63	0,5925 ^{efghijklmno}
32	2N	37,75±1.70	55,06±2.03	0,5875 ^{fghijklmno}
33	44N	38,00±4.08	54,77±4.86	0,5850 ^{fghijklmno}
34	49P	38,00±2.30	54,77±2.74	0,5850 ^{fghijklmno}
35	31N	38,00±1.82	54,76±2.17	0,5850 ^{fghijklmno}
36	39P	38,25±2.06	54,47±2.45	0,5825 ^{fghijklmno}
37	67P	38,25±0.95	54,47±1.13	0,5800 ^{fghijklmno}
38	6P	38,25±1.25	54,47±1.49	0,5800 ^{fghijklmno}

* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Student-Newman-Keuls

Tableau XXII (Suite 2) : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de *Phytophthora palmivora* BL7.11.2 après 30 jours de confrontation

N°	Isolats bactériens	Diamètres moyens du mycélium ±Ecart-type (mm)	Taux moyens d'inhibition ±Ecart-type (%)	Taux d'inhibition en valeurs transformées *
39	37N	38,25±4.42	54,47±5.26	0,5800 ^{fgijklmno}
40	46N	38,50±2.64	54,17±3.14	0,5775 ^{ghijklmno}
41	32N	38,50±3.69	54,17±4.40	0,5750 ^{ghijklmno}
42	34N	38,75±3.55	53,87±4.24	0,5725 ^{ghijklmno}
43	24N	39,00±2.44	53,57±2.91	0,5725 ^{ghijklmno}
45	34P	39,50±2.51	52,98±2.99	0,5650 ^{ghijklmno}
46	25N	39,50±2.08	52,98±2.48	0,5650 ^{ghijklmno}
47	23N	39,50±2.38	52,98±2.83	0,5625 ^{ghijklmno}
48	54P	39,50±0,00	52,98±0,00	0,5600 ^{ghijklmno}
49	45N	39,75±3.10	52,68±3.70	0,5600 ^{ghijklmno}
50	10N	39,75±1.70	52,68±2.03	0,5600 ^{ghijklmno}
51	12N	40,00±1.63	52,39±1.94	0,5575 ^{ghijklmno}
52	36N	40,00±3.82	52,39±4.56	0,5575 ^{ghijklmno}
53	51N	40,00±2.08	52,38±3.93	0,5575 ^{ghijklmno}
54	13N	40,00±3.55	52,38±4.24	0,5575 ^{ghijklmno}
55	11N	40,00±1,41	52,38±1.68	0,5550 ^{ghijklmno}
56	N111	40,00±2.94	52,38±3.50	0,5550 ^{ghijklmno}
57	53N	40,00±2.06	52,38±2.45	0,5525 ^{ghijklmno}
58	7N	40,25±2.75	52,08±3.28	0,5525 ^{ghijklmno}
59	39N	40,25±3.55	52,08±4.24	0,5525 ^{ghijklmno}
60	8N	40,25±3.30	52,08±3.93	0,5525 ^{ghijklmno}
61	20P	40,75±2.98	51,49±3.55	0,5475 ^{hijklmnop}
62	3N	40,75±0.95	51,49±1.14	0,5475 ^{hijklmnop}
63	49N	40,75±4.34	51,49±5.18	0,5475 ^{hijklmnop}
64	6N	40,75±2.21	51,49±2.64	0,5450 ^{ijklmnop}
65	30N	40,75±1.41	51,49±1.79	0,5425 ^{ijklmnop}
66	19N	41,00±1.82	51,19±2.17	0,5425 ^{ijklmnop}
67	48N	41,00±2.62	51,19±3.13	0,5425 ^{ijklmnop}
68	5N	41,00±1.82	51,19±2.17	0,5425 ^{ijklmnop}
69	38P	41,25±1.50	50,89±1.79	0,5400 ^{ijklmnop}
70	30P	41,25±1.50	50,89±1.79	0,5400 ^{ijklmnop}
71	26P	41,50±2.21	50,60±1.19	0,5375 ^{ijklmnop}
72	16P	41,50±2.36	50,59±2.81	0,5350 ^{ijklmnop}
73	69P	41,75±0.57	50,30±0.69	0,5350 ^{ijklmnop}
74	9N	41,75±1.50	50,30±1.79	0,5300 ^{ijklmnop}
75	44P	42,25±2.06	49,70±2.45	0,5275 ^{ijklmnop}
76	37P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,5250 ^{klmnop}
77	31P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,5250 ^{klmnop}
78	36P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,5250 ^{klmnop}
79	19P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,5250 ^{klmnop}
80	51P	42,50±2.08	49,40±2.48	0,5225 ^{lmnop}

* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Student-Newman-Keuls

Tableau XXII (Suite 3, fin) : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de *Phytophthora palmivora* BL7.11.2 après 30 jours de confrontation

N°	Isolats bactériens	Diamètres moyens du mycélium ±Ecart-type (mm)	Taux moyens d'inhibition ±Ecart-type (%)	Taux d'inhibition en valeurs transformées *
81	43P	43,50±1.73	48,21±2.06	0,5100 ^{lmnop}
82	29P	43,75±2.50	47,92±2.98	0,5075 ^{mnop}
83	45P	43,75±2.50	47,92±2.98	0,5075 ^{mnop}
84	63P	43,75±0.95	47,91±1.13	0,5025 ^{nop}
85	32P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,4900 ^{op}
86	41P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{op}
87	10P	47,50±2.88	43,45±3.43	0,4550 ^{pq}
88	53P	51,25±2.50	38,99±2.97	0,4050 ^{qr}
89	9P	51,25±2.50	38,99±2.97	0,4050 ^{qr}
90	55P	51,25±2.50	38,99±2.97	0,4050 ^{qr}
91	38N	51,25±2.50	38,99±2.97	0,4050 ^{qr}
92	56P	52,50±2.88	37,50±3.43	0,3900 ^{qrs}
93	27P	52,50±2.88	37,50±3.43	0,3900 ^{qrs}
94	33P	53,75±2.50	36,01±2.97	0,3750 ^{qrst}
95	21P	53,75±2.50	36,01±2.97	0,3750 ^{qrst}
96	24P	53,75±2.50	36,01±2.97	0,3750 ^{qrst}
97	52P	53,75±2.50	36,01±2.97	0,3750 ^{qrst}
98	68P	53,75±3.30	36,01±3.93	0,3725 ^{qrst}
99	58P	53,75±4.78	36,01±5.69	0,3725 ^{qrst}
100	4P	54,50±1.73	35,12±2.06	0,3650 ^{rst}
101	1P	55,00±0,00	34,53±0,00	0,3600 ^{rst}
102	28P	55,00±4.08	34,53±4.85	0,3575 ^{rst}
103	61P	55,75±6.23	33,63±7.42	0,3500 ^{rst}
104	25P	56,25±2.50	33,04±2.97	0,3425 ^{rst}
105	13P	57,50±2.88	31,55±3.43	0,3250 ^{rst}
106	22P	57,50±2.88	31,55±3.43	0,3250 ^{rst}
107	8P	58,00±3.55	30,96±4.23	0,3200 ^{rst}
108	5P	58,50±4.04	30,36±4.80	0,3150 ^{rst}
109	50P	58,75±2.50	30,06±2.97	0,3075 st
110	3P	60,00±6.27	28,58±7.46	0,2975 ^t
111	59P	60,00±0,00	28,57±0,00	0,2900 ^t
112	2P	60,00±0,00	28,58±0,00	0,2900 ^t
113	12P	60,00±0,00	28,58±0,00	0,2900 ^t
114	18P	60,00±0,00	28,58±0,00	0,2900 ^t
115	7P	60,00±0,00	28,58±0,00	0,2900 ^t
116	15P	60,00±0,00	28,58±0,00	0,2900 ^t
117	<i>P. palmivora</i>	84,00±0,00	0	0
ANOVA		p< 0,0001	F= 47,12	CV=6,92

* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Student-Newman-Keuls

8-1-1-2- Tests d'antagonisme *in vitro* des bactéries endophytes contre l'espèce *Phytophthora megakarya*

Les tests de confrontation *in vitro* ont été réalisés sur une période maximale de 30 jours pour chaque isolat. Au bout de 30 jours de confrontation, le diamètre moyen des colonies de *Phytophthora megakarya* en présence des bactéries endophytes a été réduit. Les taux d'inhibition de l'espèce *Phytophthora megakarya* par les bactéries endophytes testés ont varié de 25,3 à 64,29 %. Les isolats 42P, 47P, 60P, 18N, 22N, 66P et 63P ont inhibé la croissance du mycélium de l'espèce *Phytophthora megakarya*. Des taux d'inhibition de 64,29 à 60,13 % soit des diamètres moyens respectifs de 30 à 33,5 mm du mycélium ont été observés. Une analyse de variance portant sur les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de l'espèce *Phytophthora megakarya* a révélé une différence significative ($p < 0,0001$). Par ailleurs, le test de comparaison multiple de Student Newman-Keuls au seuil de 5 % a révélé plusieurs groupes homogènes d'isolats bactériens selon leurs effets d'inhibition sur l'espèce *Phytophthora megakarya* (Tableau XXIII).

En général, trois catégories d'effets inhibiteurs ont été observées avec la souche de *Phytophthora megakarya*. La réaction des bactéries vis-à-vis du *Phytophthora megakarya* a varié d'une bactérie à l'autre. Cependant, au bout de trente jours de confrontation les taux d'inhibition ont été inférieurs par rapport à ceux observés avec la souche *Phytophthora palmivora*.

Le premier type a été caractérisé par les isolats qui ont révélé un effet inhibiteur plus ou moins fort sur la croissance mycélienne de l'agent pathogène *Phytophthora megakarya*. Les taux d'inhibition les plus élevés étaient compris entre 59 % et 64,24 %. Ces isolats ont retardé la croissance du pathogène pendant 30 jours de confrontation. Par contre, les isolats 42P, 47P, 60P, 18N, 22N, 66P et 63P ont exercé respectivement des taux d'inhibition de 64,29 à 60,72 % soit des croissances moyennes du mycélium de 30 à 33 mm.

Le deuxième type a été caractérisé par les isolats ayant simplement bloqué l'évolution du pathogène sans toutefois réduire le mycélium. C'est donc une réaction fongistatique simple, pour ces isolats les taux d'inhibition ont varié de 50 % à 57 %.

Le troisième type est caractérisé par les isolats bactériens qui ont retardé la croissance du pathogène sans le bloquer. Les taux d'inhibitions de ces isolats ont varié de 25,3 % à 49 %.

Tableau XXIII : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de *Phytophthora megakarya* 13P30.1 après 30 jours de confrontation

N°	Isolats bactériens	Diamètres moyens du mycélium ±Ecart-type (mm)	Taux moyens d'inhibition ±Ecart-type (%)	Taux d'inhibition en valeur transformées *
1	42P	30,00±1.82	64,29±2.17	0,703 ^a
2	47P	31,25±0.95	62,8±1.13	0,683 ^{ab}
3	60P	32,75±2.98	61,02±3.55	0,660 ^{abc}
4	18N	33,00±1.70	60,72±2.03	0,658 ^{abcd}
5	22N	33,00±3.30	60,72±3.93	0,658 ^{abcd}
6	66P	33,50±2.38	60,13±2.83	0,650 ^{abcde}
7	63P	33,50±2.38	60,13±2.83	0,650 ^{abcde}
8	40P	33,75±2.62	59,83±3.12	0,645 ^{abcdef}
9	52N	34,00±3.65	59,53±4.34	0,643 ^{abcdefg}
10	65P	34,00±2.44	59,53±2.91	0,640 ^{abcdefg}
11	35N	34,25±2.38	59,23±2.83	0,638 ^{abcdefgh}
12	43N	34,50±2.06	58,94±2.45	0,638 ^{abcdefgh}
13	50N	34,50±3.00	58,94±3.57	0,635 ^{abcdefghi}
14	17P	34,50±1.70	58,94±0.59	0,635 ^{abcdefghi}
15	48P	34,50±4.27	58,94±5.08	0,633 ^{abcdefghi}
16	41N	34,75±4.42	58,64±5.26	0,633 ^{abcdefghi}
17	46P	34,75±2.62	58,64±3.12	0,630 ^{abcdefghi}
18	41P	35,00±2.44	58,34±2.91	0,630 ^{abcdefghi}
19	53P	35,00±0.00	58,34±0.00	0,628 ^{abcdefghi}
20	26P	35,25±1.82	58,04±2.17	0,625 ^{abcdefghij}
21	1N	35,25±2.06	58,04±2.45	0,625 ^{abcdefghij}
22	44N	35,50±1.91	57,75±2.27	0,623 ^{abcdefghij}
23	29N	35,50±1.00	57,75±1.19	0,620 ^{abcdefghij}
24	64P	35,50±2.64	57,75±3.14	0,618 ^{abcdefghij}
25	11P	35,50±3.30	57,75±3.93	0,618 ^{abcdefghij}
26	23P	35,75±2.94	57,45±3.50	0,618 ^{abcdefghij}
27	67P	35,75±0.50	57,45±0.59	0,618 ^{abcdefghij}
28	29P	35,75±2.21	57,45±2.63	0,618 ^{abcdefghij}
29	6P	35,75±3.40	57,45±4.05	0,618 ^{abcdefghijk}
30	14P	35,75±1.25	57,45±1.49	0,615 ^{abcdefghijk}
31	44P	35,75±1.25	57,45±1.49	0,615 ^{abcdefghijk}
32	46N	35,75±3.50	57,45±4.16	0,615 ^{abcdefghijk}
33	17N	36,00±1.70	57,15±2.03	0,613 ^{bcdefghijkl}
34	20N	36,25±2.88	56,85±3.43	0,610 ^{bcdefghijkl}
35	31N	36,50±1.00	56,56±1.19	0,605 ^{bcdefghijkl}
36	38P	36,75±2.21	56,26±2.63	0,603 ^{bcdefghijkl}
37	34N	36,75±3.77	56,26±4.49	0,603 ^{bcdefghijkl}
38	5P	37,25±2.21	55,66±2.63	0,595 ^{cdefghijklm}

* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Student-Newman-Keuls

Tableau XXIII (suite 1) : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de *Phytophthora megakarya* 13P30.1 après 30 jours de confrontation

N°	Isolats bactériens	Diamètres moyens du mycélium ±Ecart-type (mm)	Taux moyens d'inhibition ±Ecart-type (%)	Taux d'inhibition en valeur transformées *
39	54P	37,50±1.91	55,37±2.27	0,593 ^{cdefghijklm}
40	25P	37,50±1.91	55,37±2.27	0,593 ^{cdefghijklm}
41	14N	37,50±1.82	55,37±2.17	0,59 ^{bcdefghijklm}
42	42N	37,50±2.88	55,37±3.43	0,590 ^{cdefghijklm}
43	24N	37,50±4.12	55,36±4.91	0,590 ^{cdefghijklm}
44	1P	38,00±1.41	54,77±1.68	0,588 ^{cdefghijklm}
45	25N	38,00±2.82	54,77±3.36	0,585 ^{cdefghijklm}
46	31P	38,00±2.30	54,77±2.74	0,585 ^{cdefghijklm}
47	35P	38,00±2.62	54,77±3.12	0,585 ^{cdefghijklm}
48	36P	38,00±2.30	54,77±2.74	0,585 ^{cdefghijklm}
49	30P	38,00±1.41	54,77±1.68	0,585 ^{cdefghijklm}
50	33N	38,00±4.89	54,77±5.83	0,585 ^{cdefghijklm}
51	45N	38,00±3.16	54,77±3.76	0,585 ^{cdefghijklm}
52	58P	38,25±2.06	54,47±2.45	0,583 ^{cdefghijklm}
53	23N	38,25±0.95	54,47±1.13	0,583 ^{cdefghijklm}
54	11N	38,25±2.62	54,47±3.12	0,580 ^{cdefghijklm}
55	27P	38,25±2.06	54,47±2.45	0,580 ^{cdefghijklm}
56	TG-27	38,50±2.75	54,18±3.28	0,578 ^{defghijklmn}
57	37N	38,50±2.64	54,18±3.14	0,578 ^{defghijklmn}
58	34P	38,50±2.38	54,18±2.83	0,578 ^{defghijklmn}
59	32N	38,50±2.08	54,18±2.47	0,578 ^{defghijklmn}
60	51N	38,50±3.51	54,17±4.18	0,575 ^{defghijklmn}
61	13N	38,75±1.70	53,88±2.03	0,575 ^{defghijklmn}
62	38N	38,75±2.75	53,88±3.28	0,573 ^{defghijklmn}
63	2N	39,00±1.41	53,58±1.68	0,573 ^{defghijklmn}
64	12N	39,00±2.94	53,58±3.50	0,570 ^{defghijklmn}
65	10N	39,25±1.50	53,28±1.78	0,568 ^{defghijklmn}
66	5N	39,25±2.06	53,28±2.45	0,565 ^{defghijklmn}
67	21N	39,25±0.95	53,28±1.13	0,565 ^{defghijklmn}
68	16P	39,50±2.51	52,98±2.99	0,565 ^{defghijklmn}
69	10P	39,50±1.91	52,98±2.28	0,565 ^{defghijklmn}
70	3N	39,50±2.08	52,98±2.48	0,565 ^{defghijklmn}
71	69P	39,50±2.88	52,98±3.44	0,563 ^{defghijklmn}
72	8P	39,75±2.06	52,69±2.45	0,563 ^{efghijklmn}
73	26N	39,75±1.70	52,69±2.03	0,560 ^{efghijklmn}
74	36N	39,75±2.06	52,69±2.45	0,560 ^{efghijklmn}
75	53N	39,75±2.62	52,68±3.13	0,560 ^{efghijklmn}
76	28P	40,00±0,00	52,39±0,00	0,558 ^{efghijklmn}

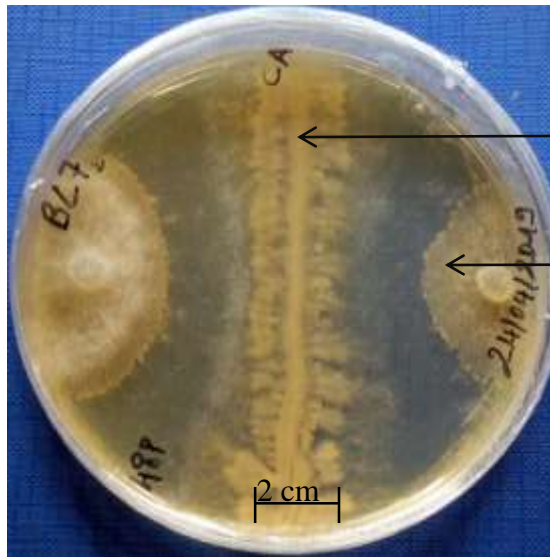
* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Student-Newman-Keuls

Tableau XXIII (suite 2) : Classement des isolats bactériens selon leurs pourcentages d'inhibition de *Phytophthora megakarya* 13P30.1 après 30 jours de confrontation

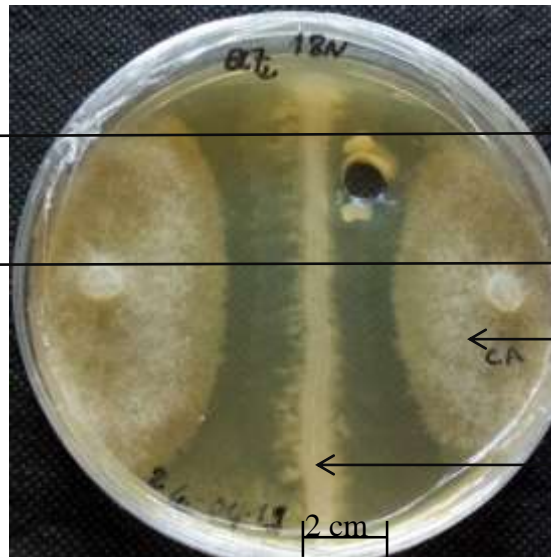
N°	Isolats bactériens	Diamètres moyens du mycélium ±Ecart-type (mm)	Taux moyens d'inhibition ±Ecart-type (%)	Taux d'inhibition en valeur transformées *
77	39N	40,00±2.94	52,39±3.50	0,555 ^{efghijklmn}
78	N1-11	40,00±2.94	52,39±3.50	0,555 ^{efghijklmn}
79	8N	40,00±2.94	52,39±3.50	0,555 ^{efghijklmn}
80	19N	40,25±2.62	52,09±3.13	0,550 ^{fghijklmn}
81	9N	40,25±2.62	52,09±3.13	0,550 ^{fghijklmn}
82	48N	40,50±2.08	51,79±2.48	0,550 ^{fghijklmn}
83	7N	40,50±2.38	51,79±2.83	0,548 ^{ghijklmn}
84	49N	40,50±3.10	51,79±3.70	0,548 ^{ghijklmn}
85	6N	40,75±0.95	51,50±1.14	0,548 ^{hijklmn}
86	49P	41,00±1.15	51,20±1.37	0,545 ^{ijklmn}
87	71P	41,00±0,00	51,20±0,00	0,545 ^{ijklmn}
88	39P	41,75±2.36	50,30±2.81	0,535 ^{klmn}
89	30N	42,25±0.95	49,71±1.14	0,525 ^{lmn}
90	24P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,525 ^{lmn}
91	32P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,525 ^{lmn}
92	19P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,525 ^{lmn}
93	43P	42,50±2.88	49,41±3.44	0,523 ^{lmn}
94	21P	43,75±2.50	47,92±2.98	0,508 ^{mn}
95	50P	43,75±2.50	47,92±2.98	0,508 ^{mn}
96	52P	43,75±2.50	47,92±2.98	0,508 ^{mn}
97	45P	43,75±2.50	47,92±2.98	0,508 ^{mn}
98	3P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
99	2P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
100	20P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
101	13P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
102	59P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
103	37P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
104	9P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
105	18P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
106	12P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
107	33P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
108	22P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
109	56P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
110	7P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
111	55P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
112	4P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
113	15P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
114	51P	45,00±0,00	46,43±0,00	0,490 ^{no}
115	61P	50,50±1.00	39,89±1.19	0,415 ^o
116	68P	62,75±3.20	25,3±3.81	0,258 ^P
117	<i>P. megakarya</i>	84,00±0,00	0	0
ANOVA		p < 0,0001	F=25,19	CV=5,67

* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Student-Newman-Keuls

Les isolats 42P, 60P et 18N ont inhibé les deux souches de *Phytophthora* pendant trente jours de confrontation, avec des taux d'inhibition de 66,37 à 63,69 % pour la souche de *Phytophthora palmivora* et de 62,80 à 60,72 % pour la souche de *Phytophthora megakarya*. Cependant, d'autres isolats tels que 48P, 23P, 47P ont uniquement inhibé une seule souche de *Phytophthora*. C'est le cas de l'isolat 48P qui a exercé un taux d'inhibition de 70,54 % sur la souche *P. palmivora* tandis qu'avec la souche de *Phytophthora megakarya*, elle a révélé un taux d'inhibition moyen de 58,94%. Ces isolats ont inhibé efficacement la croissance mycélienne des *Phytophthora* pendant trente jours d'incubation (Figure 49).

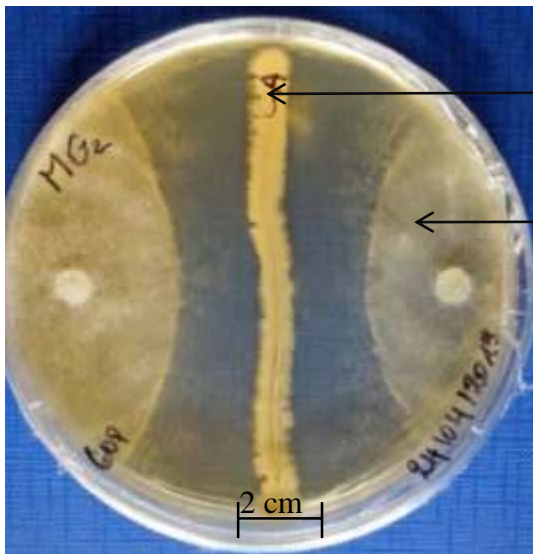


A- Inhibition de l'espèce *Phytophthora palmivora* par l'isolat bactérien 48P

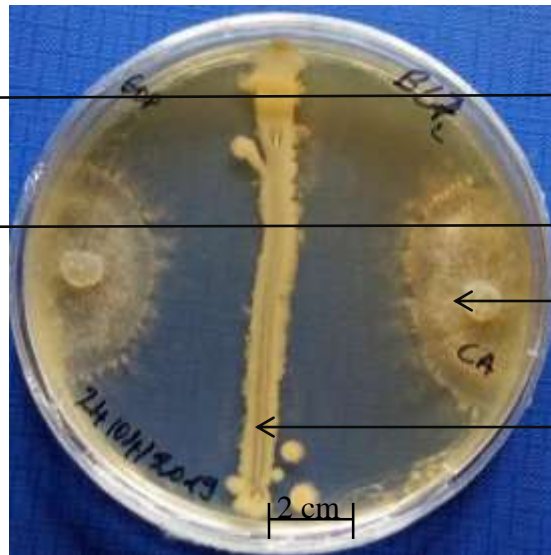


B- Inhibition de l'espèce *Phytophthora palmivora* par l'isolat bactérien 18N

Isolat
bactérien 48P
P. palmivora
P. palmivora
Isolat
bactérien 18N



C- Inhibition de l'espèce *Phytophthora megakarya* par l'isolat bactérien 60P



D- Inhibition de l'espèce *Phytophthora palmivora* par l'isolat bactérien 60P

Isolat bactérien
60P
P. megakarya
P. palmivora
Isolat
bactérien 60P

Figure 49 : Effet d'antagonisme *in vitro* de quelques bactéries endophytes du cacaoier contre les espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*

8-1-1-3- Test de survie des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* sur cabosses

Les tests de survie et d'agressivité des deux espèces de *Phytophthora* après un mois de confrontation *in vitro* avec les isolats bactériens efficaces ont été diversement concluants. En effet, les explants de mycélium prélevés dans les boîtes contenant les isolats 18N, 23P, 48P et 60P n'ont induit aucun symptôme de pourriture sur les cabosses inoculées pendant 5 jours d'incubation (Figure 50). Par contre, les 3 autres isolats (11P, 42P et 47P) n'ont pas atténué cette agressivité. Dans le premier cas, on peut supposer que les bactéries ont inhibé l'agressivité de l'agent pathogène sans toutefois le détruire complètement. Par contre, dans le second cas où les symptômes de pourriture brune sont apparus, les bactéries n'ont exercé aucun effet, inhibiteur sur les deux espèces de *Phytophthora*. Les isolats bactériens 18N, 23P, 48P et 60P ont donc été sélectionnés pour les tests d'inoculation sur feuilles.

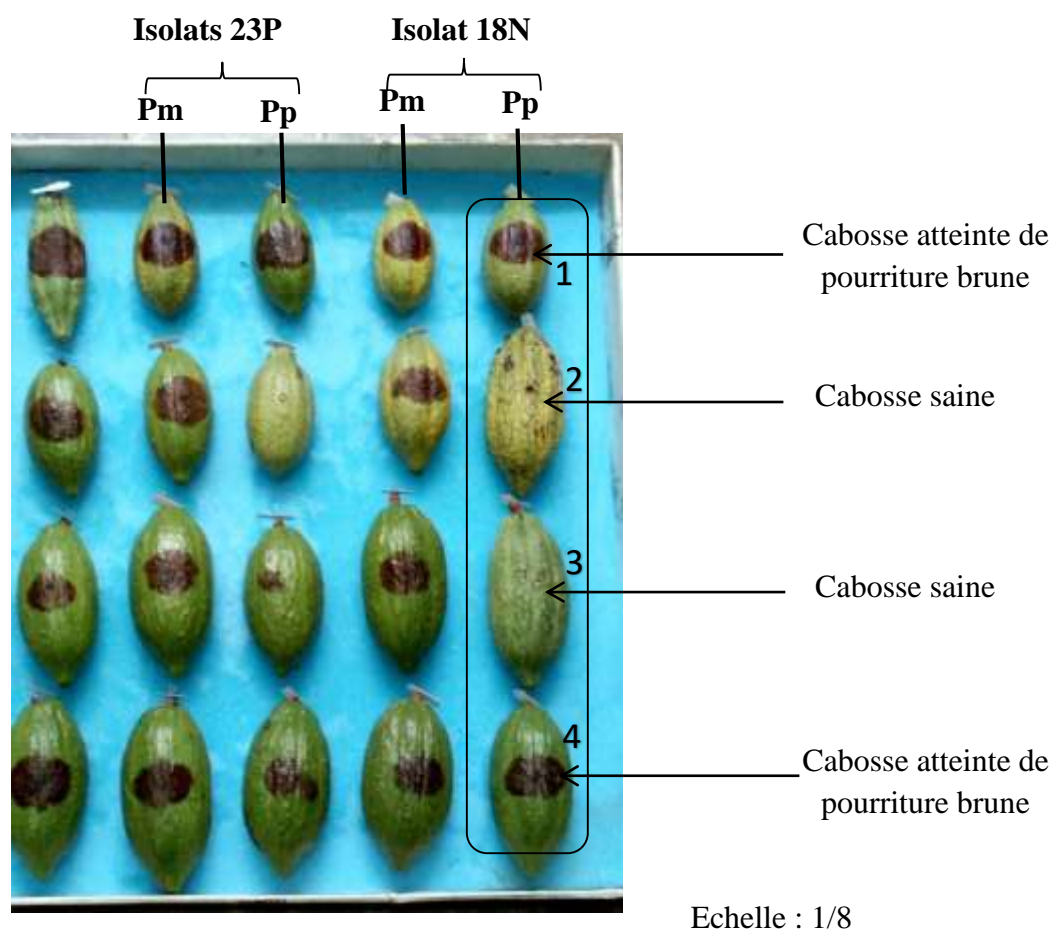


Figure 50 : Lecture des tests de survie et d'agressivité des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* après 5 jours d'incubation

Pp= *Phytophthora palmivora* ; Pm= *Phytophthora megakarya* ; 23P = Isolat 23P; 18N= Isolat 18N

(Photo : Ouattara Adama, 2019)

8-1-2- Tests d'antagonisme *ex- vivo* sur disques foliaires

8-1-2-1- Effet des traitements bactériens sur la sensibilité des clones SCA6, PA150 et NA32 aux espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*

Le traitement des disques foliaires des trois clones NA32, PA150 et SCA6 avec les isolats bactériens 23P, 48P, 60P et 18N a entraîné une réduction des indices de symptômes de pourriture brune sur celles-ci. En effet, les disques foliaires traités avec ces isolats bactériens ont montré des indices de sensibilité allant de 0,97 à 1,52. C'est-à-dire des disques foliaires ne présentant aucun symptômes (0) ou présentent des points de pénétration du pathogène mais sans nécrose (1) (Figure 51). Par contre, les témoins du clone NA32 ont présenté des valeurs des indices moyens de symptômes de 2,8 et 3,0 (présence de taches réticulées sur les disques foliaires) respectivement pour les espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*. Au niveau des témoins du clone PA150 les valeurs observées étaient de 1,71 et 1,91 (présence de points en réseau sur les disques) respectivement pour les espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*. Au niveau du clone SCA6 ces valeurs ont été de 1,61 et 1,72 (présence de points en réseau sur les disques) respectivement pour les deux espèces du genre *Phytophthora*.

Les traitements bactériens (C2AVS1, C3APS1, C3PS1, C3AVS1) de l'isolat 48P, (C2APS2, C3PS2, C3APS2, C3AVS2) de l'isolat 18N et ceux (C3PS4, C3APS4, C3AVS4) de l'isolat 23P ont montré les indices de symptômes les plus bas allant de 0,97 à 1,52. Et les traitements C3AVS1 et C3AVS2 des isolats bactériens 48P et 18N ont montré les plus bas indices respectivement de 0,97 et 1,00. Les disques foliaires ayant reçu ces traitements n'ont présenté aucun symptôme de pourriture brune malgré leur infection avec les zoospores des souches de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya*.

L'application des 4 isolats bactériens (18N, 23P, 48P, et 60P) sur des disques foliaires a réduit de façon significative ($p < 0,05$) les indices de sensibilité à la pourriture brune des trois clones de cacaoyers. Il n'y a pas eu d'effet souches de *Phytophthora* ($p = 0,5160$). Par contre, des effets significatifs ($p < 0,05$) des facteurs clones et période d'application de l'inoculum bactérien ont été observés. En effet, trois endophytes bactériens S1 (48P), S2 (18P) et S4 (23P) se sont révélés actifs vis-à-vis des deux souches de *Phytophthora*. Ils ont réduit les nécroses de pourriture brune induites par *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* au niveau des trois clones NA32, PA150 et SCA6. Les isolats bactériens 48P et 18N ont inhibé efficacement les deux souches de

Phytophthora, tandis que l'isolat 23P a inhibé modérément les deux souches. Contrairement aux autres isolats cités précédemment l'isolat 60P n'a montré aucun effet inhibiteur *ex-vivo* sur les deux souches de *Phytophthora*. Car les traitements à base de l'isolat 60P ont été proches des témoins du clone sensible NA32 comme le montre la Figure 52. Les traitements à la concentration 10^9 UFC/ml, des isolats S1 (48P) et S2 (18N) ont été les plus efficaces. Ces isolats ont réduit efficacement les nécroses symptomatiques de la pourriture brune induites par le *Phytophthora megakarya* ou le *Phytophthora palmivora* sur les disques foliaires des trois clones particulièrement le clone NA32 sensible à la pourriture brune des cabosses avec des indices de sensibilité variant de 0,97 à 1,00 (Figure 52).

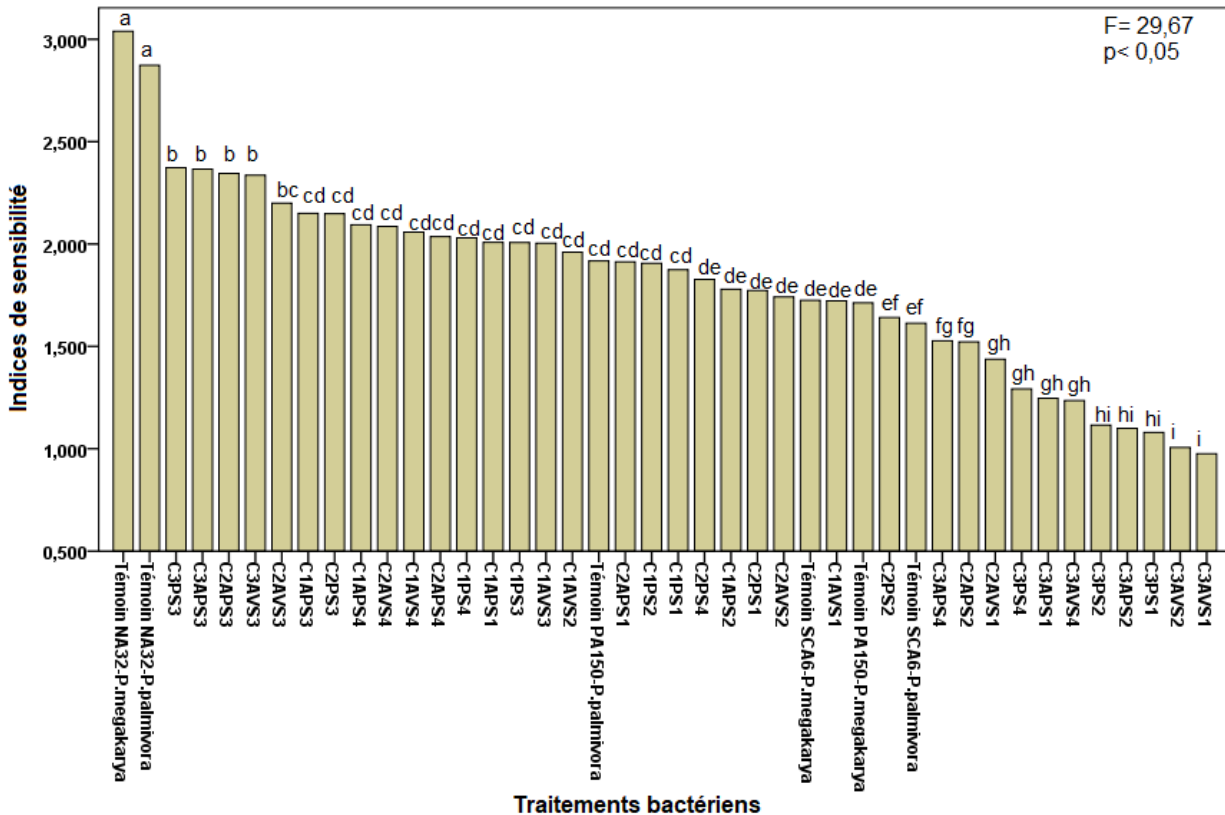
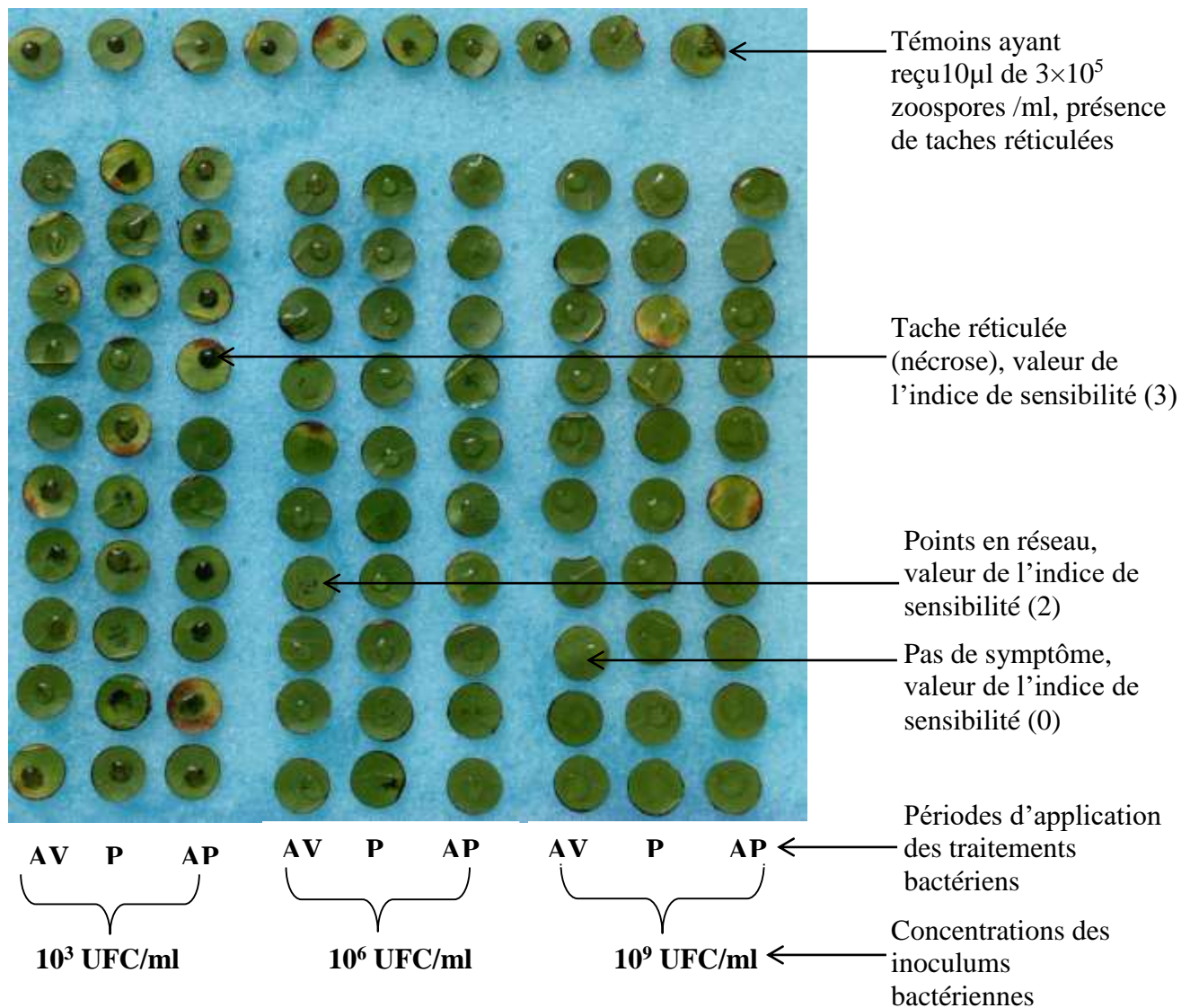


Figure 51 : Effet des traitements bactériens sur la sensibilité des clones NA32, PA150 et SCA6 aux espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*

C₁= Concentration 10³ UFC/mL ; C₂= Concentration 10⁶ UFC/mL ; C₃= Concentration 10⁹ UFC/mL ; S₁= Isolat 48P ; S₂= Isolat 18N ; S₃= Isolat 60P ; S₄= Isolat 23P ; Les moyennes avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le Test de Test de Student-Newman-Keuls (au seuil $\alpha= 0,05$).

- Traitement₁ **C1AVS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C1 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₂ **C1PS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C1 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₃ **C1APS1**= inoculer la bactérie S1 (48) à la concentration C1 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₄ **C2AVS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C2 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₅ **C2PS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C2 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₆ **C2APS1**= inoculer la bactérie S1 (48) à la concentration C2 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₇ **C3AVS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C3 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₈ **C3PS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C3 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₉ **C3APS1**= inoculer la bactérie S1 (48) à la concentration C3 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₁₀ **C1AVS2** = inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C1 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₁₁ **C1PS2** = inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C1 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₁₂ **C1APS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C1 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₁₃ **C2AVS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C2 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₁₄ **C2PS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C2 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₁₅ **C2APS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C2 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₁₆ **C3AVS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C3 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₁₇ **C3PS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C3 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₁₈ **C3APS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C3 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₁₉ **C1AVS3** = inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C1 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₂₀ **C1PS3** = inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C1 simultanément avec le *Phytophthora* ;

- Traitement₂₁ **C1APS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C1 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₂₂ **C2AVS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C2 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₂₃ **C2PS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C2 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₂₄ **C2APS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C2 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₂₅ **C3AVS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₂₆ **C3PS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₂₇ **C3APS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 1heure après inoculation du *Phytophthora*.
- Traitement₂₈ **C1AVS4** = inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₂₉ **C1PS4** = inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₃₀ **C1APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₃₁ **C2AVS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₃₂ **C2PS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₃₃ **C2APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₃₄ **C3AVS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₃₅ **C3PS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 simultanément avec le *Phytophthora* ;
- Traitement₃₆ **C3APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement **Témoin NA32-*P. palmivora***= inoculer les disques foliaire du clone NA32 avec l'inoculum de zoospores de *P.palmivora* seul ;
- Traitement **Témoin NA32-*P. megakarya***= inoculer les disques foliaire du clone NA32 avec l'inoculum de zoospore de *P. megakarya* seul ;
- Traitement **Témoin PA150-*P. palmivora***= inoculer les disques foliaire du clone PA150 avec l'inoculum de zoospores de *P.palmivora* seul ;
- Traitement **Témoin PA150-*P. megakarya***= inoculer les disques foliaire du clone PA150 avec l'inoculum de zoospore de *P. megakarya* seul ;
- Traitement **Témoin SCA6-*P. palmivora***= inoculer les disques foliaire du clone SCA6 avec l'inoculum de zoospores de *P.palmivora* seul ;
- Traitement **Témoin NA32-*P. megakarya***= inoculer les disques foliaire du clone SCA6 avec l'inoculum de zoospore de *P. megakarya* seul ;



Echelle : 1/2

Figure 52 : Effet fongicide des endophytes bactériens (18N et 48P) sur les espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* au niveau des disques foliaires du clone NA32

AV = traitements où l'inoculum bactérien a été appliqué une heure de temps avant d'apporter les zoospores de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya*; P= traitements où l'inoculum bactérien et les zoospores de *Phytophthora* ont été appliqués simultanément ; AP= traitements où les zoospores de *Phytophthora* ont été appliqués une heure avant d'apporter l'inoculum bactérien.

(Photo : Ouattara Adama, 2019)

8-1-2-2- Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce *Phytophthora megakarya*

Lorsque le clone NA32 a été infecté avec la souche *Phytophthora megakarya*, les traitements bactériens ont réduit les indices de sensibilité à la pourriture brune. En effet, les traitements (C3APS1, C3AVS1) de l'isolat 48P, (C3AVS2, C3APS2, C3PS2) de l'isolat 18N et (C3PS4, C3AVS4) de l'isolat 23P ont montré des valeurs de 1,11 à 1,13 (aucun symptôme) de l'indice de sensibilité contre une valeur de 3,0 (tache réticulée) pour le témoin. Contrairement, les traitements (C3APS3, C3PS3 et C2APS3) de l'isolat 60P (S3) ont montré des valeurs de 2,89 à 2,90 (taches réticulées).

Les traitements bactériens appliqués ont eu un effet significatif ($p < 0,0001$) sur l'apparition des symptômes de pourriture brune. Les isolats 48P, 18N et 23P ont été les plus efficaces contrairement à l'isolat S3 qui n'a pas réagi. Les concentrations 10^9 UFC / ml de ces isolats ont été plus efficaces. Les traitements à base des isolats 48P, 23P et 18N appliqués une (01) heure de temps avant l'apport de l'inoculum du *Phytophthora megakarya* ont été respectivement les plus efficaces contre la souche de *Phytophthora megakarya* avec des indices moyens des symptômes de pourriture brune de 1,117, 1,136 et de 1,19 soit des disques foliaires présentant des points de pénétration simples. Par ailleurs, un effet efficace des traitements à base de ces isolats a été observé lorsqu'ils ont été appliqués simultanément avec l'inoculum du *Phytophthora megakarya* (Figure 53).

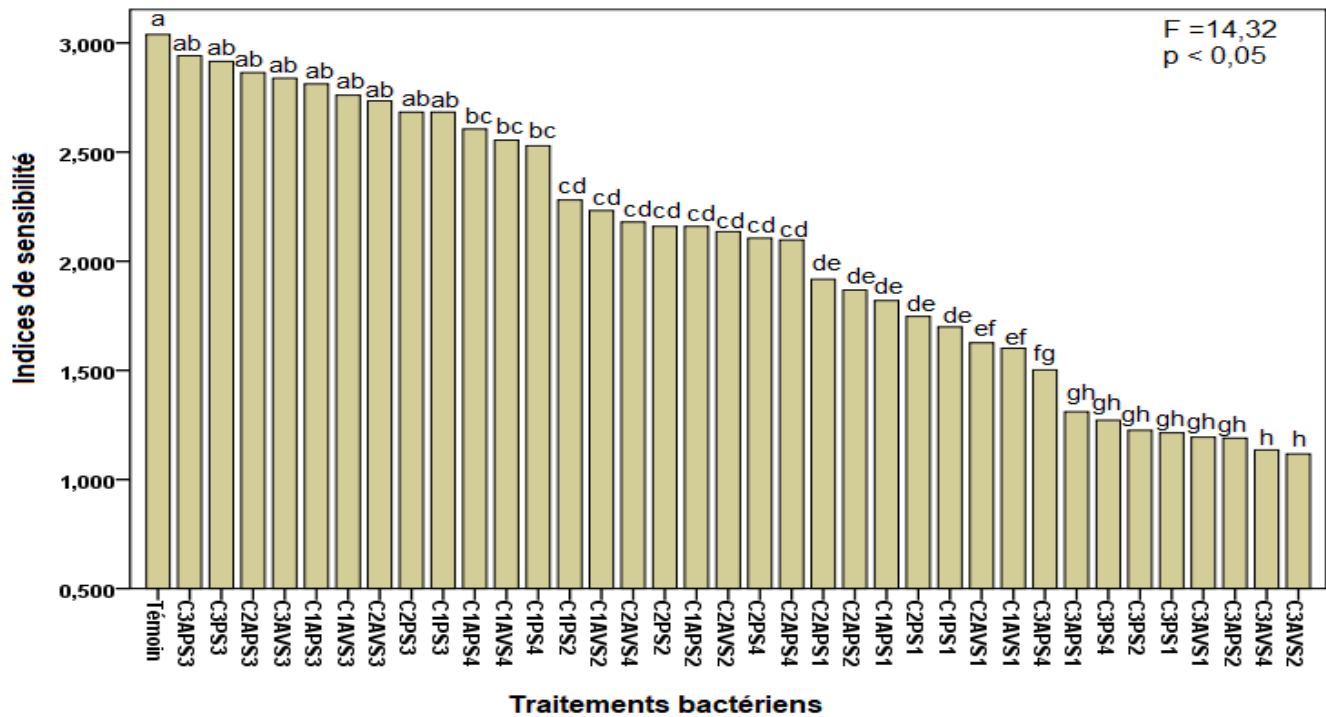


Figure 53 : Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce *Phytophthora megakarya*

C₁= Concentration 10³ UFC/ml ; C₂= Concentration 10⁶ UFC/ml ; C₃= Concentration 10⁹ UFC/ml ; S₁= Isolât 48P ; S₂= Isolât 18N ; S₃= Isolât 60P ; S₄= Isolât 23P 3. Les moyennes avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le Test de Test de Student-Newman-Keuls (au seuil $\alpha=0,05$).

Traitement₁ **C1AVS1**= inoculer la bactérie S₁ (48P) à la concentration C₁ 1heure avant le *P. megakarya* ;

Traitement₂ **C1PS1**= inoculer la bactérie S₁ (48P) à la concentration C₁ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₃ **C1APS1**= inoculer la bactérie S₁ (48) à la concentration C₁ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

Traitement₄ **C2AVS1**= inoculer la bactérie S₁ (48P) à la concentration C₂ 1heure avant le *P. megakarya* ;

Traitement₅ **C2PS1**= inoculer la bactérie S₁ (48P) à la concentration C₂ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₆ **C2APS1**= inoculer la bactérie S₁ (48) à la concentration C₂ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

Traitement₇ **C3AVS1**= inoculer la bactérie S₁ (48P) à la concentration C₃ 1heure avant le *P. megakarya* ;

Traitement₈ **C3PS1**= inoculer la bactérie S₁ (48P) à la concentration C₃ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₉ **C3APS1**= inoculer la bactérie S₁ (48) à la concentration C₃ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

Traitement₁₀ **C1AVS2** = inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₁ 1heure avant le *P. megakarya* ;

Traitement₁₁ **C1PS2** = inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₁ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₁₂ **C1APS2**= inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₁ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

Traitement₁₃ **C2AVS2**= inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₂ 1heure avant le *P. megakarya* ;

Traitement₁₄ **C2PS2**= inoculé la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₂ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₁₅ **C2APS2**= inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₂ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

Traitement₁₆ **C3AVS2**= inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₃ 1heure avant le *Phytophthora* ;

Traitement₁₇ **C3PS2**= inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₃ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₁₈ **C3APS2**= inoculer la bactérie S₂ (18N) à la concentration C₃ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

Traitement₁₉ **C1AVS3** = inoculer la bactérie S₃ (60P) à la concentration C₁ 1heure avant le *P. megakarya* ;

Traitement₂₀ **C1PS3** = inoculer la bactérie S₃ (60P) à la concentration C₁ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₂₁ **C1APS3**= inoculer la bactérie S₃ (60P) à la concentration C₁ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

Traitement₂₂ **C2AVS3**= inoculer la bactérie S₃ (60P) à la concentration C₂ 1heure avant le *P. megakarya* ;

Traitement₂₃ **C2PS3**= inoculer la bactérie S₃ (60P) à la concentration C₂ simultanément avec le *P. megakarya* ;

Traitement₂₄ **C2APS3**= inoculer la bactérie S₃ (60P) à la concentration C₂ 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;

- Traitement₂₅ **C3AVS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 1heure avant le *P. megakarya* ;
Traitement₂₆ **C3PS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 simultanément avec le *P. megakarya* ;
Traitement₂₇ **C3APS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;
Traitement₂₈ **C1AVS4** = inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 1heure avant le *P. megakarya* ;
Traitement₂₉ **C1PS4** = inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 simultanément avec le *P. megakarya* ;
Traitement₃₀ **C1APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;
Traitement₃₁ **C2AVS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 1heure avant le *P. megakarya* ;
Traitement₃₂ **C2PS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 simultanément avec le *P. megakarya* ;
Traitement₃₃ **C2APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;
Traitement₃₄ **C3AVS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 1heure avant le *P. megakarya* ;
Traitement₃₅ **C3PS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 simultanément avec le *P. megakarya* ;
Traitement₃₆ **C3APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 1heure après inoculation du *P. megakarya* ;
Traitement **Témoin** = inoculer les disques foliaire du clone NA32 avec l'inoculum de zoospores de *P. megakarya* seul

8-1-2-3- Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce *Phytophthora palmivora*

Dans le cas où le clone NA32 a été inoculé avec la souche de *Phytophthora palmivora*, les traitements bactériens appliqués ont réduit les indices des symptômes d'apparition de la pourriture brune sur les disques foliaires. Certains traitements bactériens ont induit des valeurs plus faibles d'indices de sensibilité. En effet, des valeurs de 0,76 à 1,14 ont été observées contre des valeurs d'indices de 3,15 pour le témoin. Donc, les disques foliaires ayant reçu ces traitements bactériens n'ont pas présenté de symptômes, tandis que les témoins ont présenté des taches réticulées. Les traitements (C3APS1, C3PS1, C3AVS1) et (C2APS2 C3PS2, C3APS2, C3AVS2) des isolats 48P (S1) et 18N (S2) ont montré les indices de sensibilité les plus bas allant 0,76 à 1,33.

Ces isolats (18N et 48P) ont été les plus efficaces. L'isolat 23P a réagi très faiblement, tandis que l'isolat 60P n'a pas du tout réagi. Les concentrations 10^9 UFC / ml d'inoculum des isolats 48P et 18N ont été les plus efficaces. L'isolat 23P semble stimuler le pathogène à la concentration 10^9 UFC / ml. Les traitements bactériens appliqués ont eu un effet significatif ($p < 0,0001$) sur l'apparition des symptômes de pourriture brune. Car, les traitements à base des isolats 48P et 18N ont été plus efficaces. Les indices moyens de symptômes de pourriture brune respectifs observés avec ces traitements ont été de 0,76 0,94. Pour ces traitements et les disques foliaires n'ont pas présenté de symptômes d'apparition de (Figure 54).

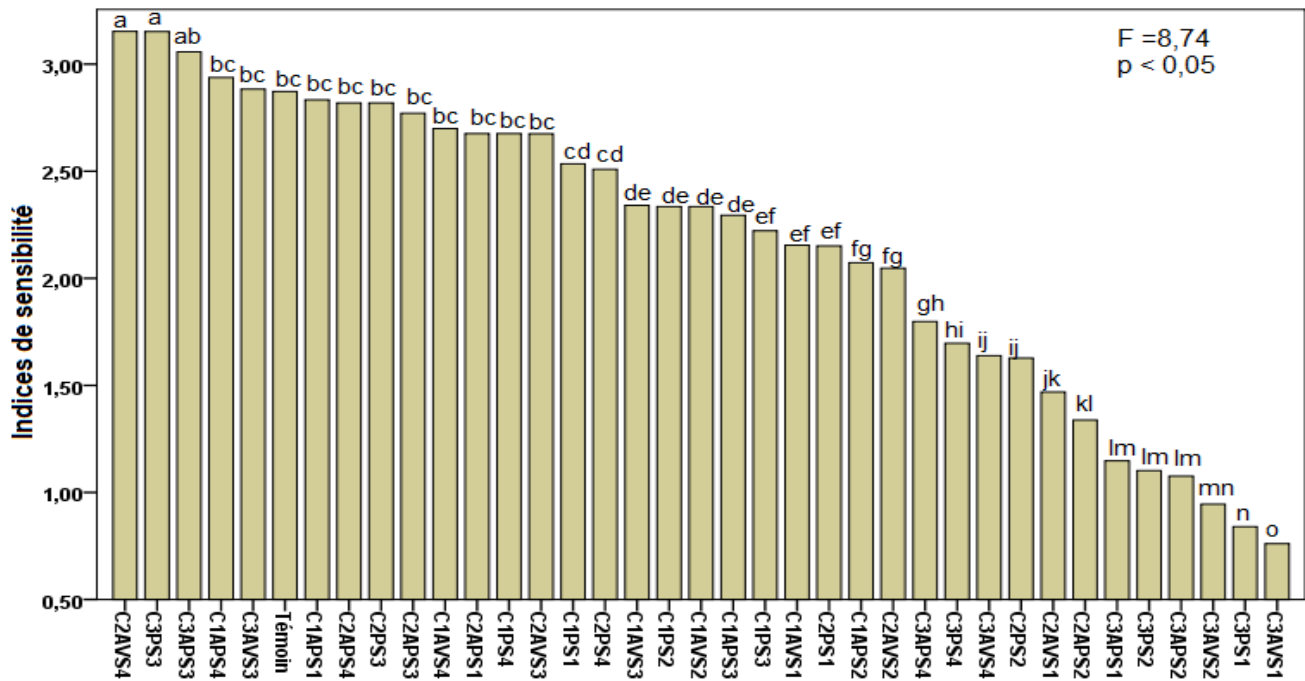


Figure 54 : Effet des traitements bactériens sur la sensibilité du clone NA32 à l'espèce *Phytophthora palmivora*

C₁= Concentration 10³ UFC/ml ; C₂= Concentration 10⁶ UFC/ml ; C₃= Concentration 10⁹ UFC/ml ; S1= Isolât 48P ; S2= Isolât 18N ; S3= Isolât 60P ; S4= Isolât 23P. Les moyennes avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives selon le Test de Test de Student-Newman-Keuls (au seuil $\alpha= 0,05$).

- Traitement₁ **C1AVS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C1 1heure avant le *P. palmivora* ;
- Traitement₂ **C1PS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C1 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₃ **C1APS1**= inoculer la bactérie S1 (48) à la concentration C1 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
- Traitement₄ **C2AVS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C2 1heure avant le *P. palmivora* ;
- Traitement₅ **C2PS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C2 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₆ **C2APS1**= inoculer la bactérie S1 (48) à la concentration C2 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
- Traitement₇ **C3AVS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C3 1heure avant le *P. palmivora* ;
- Traitement₈ **C3PS1**= inoculer la bactérie S1 (48P) à la concentration C3 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₉ **C3APS1**= inoculer la bactérie S1 (48) à la concentration C3 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
- Traitement₁₀ **C1AVS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C1 1heure avant le *Phytophthora* ;
- Traitement₁₁ **C1PS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C1 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₁₂ **C1APS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C1 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
- Traitement₁₃ **C2AVS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C2 1heure avant le *P. palmivora* ;
- Traitement₁₄ **C2PS2**= inoculé la bactérie S2 (18N) à la concentration C2 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₁₅ **C2APS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C2 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
- Traitement₁₆ **C3AVS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C3 1heure avant le *P. palmivora* ;
- Traitement₁₇ **C3PS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C3 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₁₈ **C3APS2**= inoculer la bactérie S2 (18N) à la concentration C3 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
- Traitement₁₉ **C1AVS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C1 1heure avant le *P. palmivora* ;
- Traitement₂₀ **C1PS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C1 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₂₁ **C1APS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C1 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
- Traitement₂₂ **C2AVS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C2 1heure avant le *P. palmivora* ;
- Traitement₂₃ **C2PS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C2 simultanément avec le *P. palmivora* ;
- Traitement₂₄ **C2APS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C2 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;

- Traitement₂₅ **C3AVS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 1heure avant le *P. palmivora* ;
Traitement₂₆ **C3PS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 simultanément avec le *P. palmivora* ;
Traitement₂₇ **C3APS3**= inoculer la bactérie S3 (60P) à la concentration C3 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
Traitement₂₈ **C1AVS4** = inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 1heure avant le *P. palmivora* ;
Traitement₂₉ **C1PS4** = inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 simultanément avec le *P. palmivora* ;
Traitement₃₀ **C1APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C1 1heure après inoculation du *Phytophthora* ;
Traitement₃₁ **C2AVS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 1heure avant le *Phytophthora* ;
Traitement₃₂ **C2PS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 simultanément avec le *P. palmivora* ;
Traitement₃₃ **C2APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C2 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
Traitement₃₄ **C3AVS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 1heure avant le *P. palmivora* ;
Traitement₃₅ **C3PS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 simultanément avec le *P. palmivora* ;
Traitement₃₆ **C3APS4**= inoculer la bactérie S4 (23P) à la concentration C3 1heure après inoculation du *P. palmivora* ;
Traitement **Témoin**= inoculer les disques foliaire du clone NA32 avec l'inoculum de zoospores de *P. palmivora* seul

8-2- Discussion

8-2-1- Test d'antagonisme *in vitro*

Les tests de confrontation *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'existence des endophytes bactériens antagonistes capables d'inhiber la croissance mycélienne des souches *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*. Ces bactéries endophytes ont exercé une forte activité inhibitrice sur la croissance mycélienne des deux souches de *Phytophthora*. La réduction effective du diamètre des colonies mycéliennes durant trente jours de confrontation et l'observation d'une zone d'inhibition de part et d'autre de la strie bactérienne ont révélé que ces isolats produisaient des substances inhibitrices (Acebo-Guerrero *et al.*, 2015). Les tests de survie conduits sur des cabosses fraîches ont confirmé l'effet antagoniste des isolats 18N, 23P, 60P et 48P. Par contre, les isolats 42P, 47P et 11P ont été jugés inefficaces à l'issue de ces tests. Ceux-ci ont simplement inhibé la croissance des *Phytophthora* par la diminution des nutriments dans le milieu de culture. Ces isolats ont des effets d'antagonismes dits fongistatiques simples. Par contre, les isolats (18N, 23P, 60P et 48P) ont eu des effets d'antibiose sur le genre *Phytophthora* et ces effets ont été plus ou moins prononcés, selon l'isolat bactérien et selon la souche de *Phytophthora*. Des études ont montré l'existence de microorganismes antagonistes du genre *Phytophthora* dans l'écosystème du cacaoyer (Kébé *et al.*, 2009 ; Acebo-Guerrero *et al.*, 2015).

Ces isolats ont restreint sur le milieu de culture la croissance radiale du mycélium des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* avec des pourcentages d'inhibition (P.I) respectifs de 28,58 à 70,54 % et de 25,3 à 64,29 %. Des résultats similaires ont été obtenus par Akrofi *et al.* (2017). Ils ont montré que des bactéries épiphytes isolées à la surface des cabosses de trois clones de cacaoyer (SCA6, T85/799 et de IFC5 tous résistants à la pourriture brune) ont inhibé fortement la croissance de l'espèce *Phytophthora palmivora* avec des pourcentages d'inhibition plus élevés de 69,7 et 65,8 %. Masanto *et al.* (2020) ont aussi révélé la présence des bactéries endophytes dans les organes et de la rhizosphère du cacaoyer. Ces bactéries endophytes ont exercé des effets inhibiteurs sur l'espèce *Phytophthora palmivora* avec des pourcentages d'inhibition variables de 0,01 à 100 (Annexe 7).

Les bactéries endophytes identifiées dans cette étude comme antagonistes des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* appartiennent au genre *Bacillus* sp. Par ailleurs, le test de survie fongique a confirmé l'effet antagoniste de ces bactéries contre les champignons du genre

Phytophthora spp. Des bactéries endophytes isolées du concombre ont aussi révélé une activité antagoniste *in vitro* contre l'agent phytopathogène *Fusarium oxysporum* (Ozaktan *et al.*, 2015).

8-2-2- Test d'antagonisme *ex-vivo* par tests feuilles

Les tests feuilles ont révélé l'effet fongicide des bactéries endophytes contre *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*. Ces tests feuilles ont été réalisés dans des conditions proches des conditions naturelles de développement du genre *Phytophthora*. C'est-à-dire en présence d'une forte humidité et une température optimale de 26°C à l'obscurité. L'effet fongicide des isolats S1 (48P) et S2 (18P) a été mis en évidence par la réduction effective des nécroses symptomatiques de pourriture brune au niveau des trois clones et particulièrement au niveau du clone sensible NA32. Cela montre que ces isolats ont induit une résistance au clone NA32 d'une part, et d'autre part ont augmenté la résistance intrinsèque des clones PA150 et SCA6 (Tahi *et al.*, 2007 ; Kébé *et al.*, 2009).

Les traitements à base de l'isolat S3 (60P) n'ont montré aucun effet inhibiteur sur les nécroses de pourriture brune au niveau des trois clones. En effet, dans les cultures *in vitro*, l'isolat 60P se développe lentement (temps de génération TG > 48 heures) par rapport aux autres isolats (temps de génération TG < 24 heures). L'effet inhibiteur montré par cet isolat dans les cultures de confrontation *in vitro* serait dû à une substance antifongique volatile qu'il produit. Dans la boîte de Pétri, la bactérie a eu le temps et les nutriments nécessaires pour se développer. Ce qui n'est pas le cas dans les tests feuilles. Dans ce cas, les souches de *Phytophthora* sont dans un milieu favorable à leur croissance, donc les zoospores se développent très rapidement (Surujdeo-Maharaj *et al.* 2016). D'où, l'inefficacité de l'isolat 60P qui se développe très lentement. Selon Méija *et al.* (2008), les résultats des tests d'antagonismes *in vitro* ne reflètent pas forcément ceux obtenus *ex-vivo* ou *in vivo*. Certains microorganismes révélés très antagonistes *in vitro* peuvent s'avérer inefficaces dans les tests *ex-vivo* ou en condition de champs car de nombreux paramètres écologiques sont pris en compte.

Les traitements bactériens appliqués sur les disques foliaires une heure de temps avant l'apport de l'inoculum fongique ont été les plus efficaces. Cela montre que ces bactéries endophytes créent une barrière contre la pénétration des agents pathogènes au niveau des stomates. Les bactéries endophytes ont l'avantage de s'adapter et de coloniser facilement les tissus du cacaoyer (Paul *et al.*, 2013). Ce qui pourrait traduire cette induction de résistance au clone sensible NA32.

Par ailleurs, ces isolats produisent certainement des substances antifongiques qui neutralisent le développement des zoospores au niveau des disques foliaires même si l'inoculum de zoospores des *Phytophthora* a été appliqué une heure de temps avant l'application de l'inoculum des isolats bactériens (Zubir *et al.*, 2019).

Kébé *et al.* (2009) ont mis en évidence l'existence de bactéries indigènes des sols sous cacaoyères capables de réduire la sensibilité de deux clones de cacaoyer (P7 et SCA6) à la pourriture brune. Ils ont obtenu ces résultats par des tests feuilles avec l'espèce *Phytophthora palmivora*. Melnick *et al.* (2008) ont isolé des bactéries endophytes du genre *Bacillus* des plants de tomate. Ces isolats ont pu réduire les nécroses de la pourriture brune induites par *P. palmivora* sur le cacaoyer. Plus tard, Melnick *et al.* (2011) ont isolé des bactéries endophytes sporulant à partir des organes (racines, tiges, cabosses, feuilles et fleurs) du cacaoyer. Ils ont identifié des isolats bactériens qui avaient des activités antagonistes *in vitro* et *in vivo* contre les champignons pathogènes *P. palmivora*, *Monilliothora roreri* et *M. perniciososa* responsables respectivement de la pourriture brune de cabosses, du balai de sorcière et de la pourriture noire des cabosses en Amérique du sud. Zubir *et al.* (2019) ont aussi obtenu des résultats similaires. En effet, ils ont isolé des bactéries endophytes du cacaoyer qui avaient des activités antagonistes contre l'agent pathogène fongique *Oncobasidium theobromae*, responsable de la maladie du syndrome de dépérissement vasculaire du cacaoyer. Cette maladie serait la cause de grandes pertes de production en Malaisie. Les travaux de Giyanto *et al.* (2020), ont aussi identifié des bactéries endophytes du cacaoyer capables de lutter biologiquement contre l'agent pathogène fongique *Ceratobasidium theobromae* en Indonésie.

Selon les travaux de Tahi *et al.* (2000 ; 2006 a ; 2007) et de Nyassé *et al.* (2002), les résultats des tests de résistance sur les feuilles ont été corrélés avec ceux obtenus au champ sur les feuilles et sur les cabosses. Ainsi, les isolats bactériens ayant induit une résistance sur feuilles des clones testés aux espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* peuvent être des candidats potentiels de lutte biologique contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer en Côte d'Ivoire. Par ailleurs, la caractérisation biochimique a révélé que les quatre isolats bactériens testés appartiennent au genre *Bacillus* sp.

Des travaux antérieurs ont révélé que les endophytes bactériens du cacaoyer sont généralement du genre *Bacillus* sp (Melnick *et al.*, 2011 ; Zubir *et al.*, 2019 ; Giyanto *et al.*, 2020). Wang *et al.* (2012) ont rapporté que *B. cereus* pouvait inhiber la croissance d'*Aspergillus flavus* en produisant l'enzyme chitinase. De nombreuses études ont aussi révélé les bactéries des genres *Bacillus* sp. et

Pseudomonas sp. potentiels agents de lutte biologique contre diverses maladies des plantes (Hanada *et al.*, 2009 ; Khan *et al.*, 2018).

8-3- Conclusion partielle

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de bactéries endophytes antagonistes de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya*. Les résultats des tests *in vitro* ont montré que les bactéries endophytes ont inhibé la croissance du mycélium des deux souches de *Phytophthora* testées. Des pourcentages d'inhibition de 70,54 et 64,29 % de croissance de mycélium ont été exercés par ces isolats bactériens respectivement contre *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya*. Quatre (4) isolats dont trois (3) 48P, 60P et 23P isolées de la variété P7 et un isolat (1) 18N isolé de la variété NA32 ont été les plus efficaces à l'issue des tests *in vitro*. Les tests feuilles ont révélé les concentrations 10^9 UFC / ml des isolats 48P et 18N plus efficaces. En effet, ces isolats ont été appliqués une heure de temps avant ou simultanément avec l'inoculum des espèces de *Phytophthora*. Et ils ont réduit la sensibilité des trois clones NA32, PA150 et SCA6 à la pourriture brune. Cette induction de résistance a été plus remarquable au niveau du clone NA32 sensible à la pourriture brune. Cette étude prouve le potentiel antagoniste des bactéries endophytes du cacaoyer et leur utilisation possible dans la lutte biologique contre la pourriture brune. Ces isolats pourront faire l'objet des tests sur cabosses et des essais au champ afin de confirmer la stabilité de leurs effets antagonistes contre *Phytophthora* spp.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Cette étude avait pour objectif général de rechercher des bactéries endophytes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) ayant des propriétés d'intérêt agronomique (fixation de l'azote, solubilisation du phosphate tricalcique et du potassium) et capables de lutter contre la pourriture brune des cabosses. Au total deux cent dix-huit (218) isolats ont été obtenus des principaux organes (racines, tiges et feuilles) de jeunes plants de cacaoyers. Ces bactéries endophytes isolées sur un milieu pauvre en azote ont été soumises à une série de criblages dont le premier a consisté à sélectionner les isolats bactériens capables de solubiliser le phosphate tricalcique et le mica et tolérer les stress abiotiques (pH, métaux lourds et les intrants azotés NPK, KNO₃, urée et NaNO₂). Au total quarante-cinq (45) bactéries endophytes issues des clones P7 et NA32 ont solubilisé le phosphate tricalcique avec des indices de solubilisation supérieurs ou égaux à 70 %. Les indices de solubilisation du phosphate tricalcique ont varié de 20 à 200 %, tandis que les indices de solubilisation du mica ont varié de 70 à 300 %. Sept endophytes bactériens 4P, 5P, 38P, 39P, 40P, 41P et 53N, provenant des plants de cacaoyers cultivés sur les sols prélevés dans les localités de Duékoué et de Soubré, ont montré des indices de solubilisation plus élevés de 150 à 200 %.

La caractérisation physiologique a permis d'identifier quarante-cinq (45) isolats d'intérêt agronomique par rapport à différents stress abiotiques tels que la salinité, les intrants azotés (NPK, KNO₃, urée et NaNO₂). Ces endophytes bactériens ont pu croître sur des milieux ayant des pH allant de 3,5 à 10. L'osmotolérance s'est révélée importante pouvant aller jusqu'à 10 % de NaCl. Ces endophytes bactériens ont aussi montré une bonne tolérance aux engrais azotés (NPK-0-23-19 et KNO₃). Cependant, une sensibilité bien marquée a été observée avec l'urée et le nitrite de sodium. Ces isolats ont aussi montré une bonne capacité à solubiliser le phosphate tricalcique sous stress salin, acido-basique et des métaux lourds. Deux isolats 37N et 21P ont révélé une multi-résistance aux métaux lourds et des indices de solubilisation du phosphate tricalcique compris entre 50 et 100 %. La caractérisation biochimique a révélé que ces quarante-cinq (45) endophytes bactériens d'intérêt agronomique appartiennent à deux genres (*Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp.) avec une prédominance du genre *Bacillus* sp.

Dans la deuxième partie de cette étude cent seize (116) bactéries endophytes issues des clones P7 et NA32 ont été évalués dans des tests *in vitro* et dans des biotests (sur disques foliaires et sur des cabosses immatures) contre les espèces fongiques *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*. Dans les tests *in vitro*, les endophytes bactériens ont inhibé la croissance du mycélium

des deux espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* pendant 30 jours de confrontation. Les pourcentages d'inhibition ont varié respectivement de 28,58 à 70,54 % et de 25,3 à 64,29 % pour *Phytophthora palmivora* (BL7.11.2) et *Phytophthora megakarya* (13P30.1). A l'issue des tests *in vitro* quatre isolats (48P, 60P, 23P et 18N) tous du genre *Bacillus* sp. se sont révélés plus efficaces. Les tests feuilles ont révélé deux isolats 48P et 18N plus efficaces contre la pourriture brune. En effet, lorsque ces isolats ont été appliqués à une concentration de 10^9 UFC / mL d'inoculum sur les disques foliaires une heure de temps avant ou simultanément avec apport d'inoculum de zoospores des des deux espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*, une réduction significative de l'apparition des nécroses symptomatiques sur les disques foliaires a été observée. Ce qui traduisait une induction de résistance aux trois clones et cette induction de résistance a été plus remarquable au niveau du clone sensible NA32. Ces résultats prometteurs prouvent qu'il est possible de trouver des endophytes bactériens antagonistes des agents phytopathogènes du genre *Phytophthora* spp. et de les utiliser comme agents de biocontrôle contre la pourriture brune des cabosses.

Les cacaoyers locaux hébergent donc effectivement des bactéries endophytes qui ont des propriétés d'intérêt agronomique et antagonistes des espèces *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya*. L'utilisation des endophytes bactériens non pathogènes en tant que biofertilisant et / ou biopesticides est une technologie émergente et écologiquement compatible considérée comme alternative prometteuse aux engrais et pesticides de synthèse. Ces résultats encourageants, obtenus au cours de cette étude constitueraient une contribution à la lutte biologique contre la pourriture brune des cabosses dans la mesure où l'application des endophytes bactériens renforce la résistance intrinsèque du matériel végétal à *Phytophthora palmivora* et à *Phytophthora megakarya*. Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces endophytes bactériens dans la lutte contre les maladies due au genre *Phytophthora* spp. sur le cacaoyer en Côte d'Ivoire. Toutefois, cette éventualité ne pourra être envisagée que si l'efficacité des traitements bactériens observée *in vitro* et *ex-vivo* sur disques foliaires, se confirme en milieu réel sur le cacaoyer.

En perspective, il serait donc nécessaire :

- d'évaluer l'effet biofongicide des bactéries (18N et 48P) antagonistes des espèces de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya* en condition de champ ;

- de réaliser la caractérisation moléculaire et l'identification complète des endophytes bactériens d'intérêt agronomique et de biocontrôle identifiés dans cette étude ;
- d'élaborer un inoculum bactérien performant capable de lutter contre la pourriture brune.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaraújo W. L., Marcon J., Maccheroni W. Jr., van Elsas J. D., van Vuurde J. W. L. & Azevedo J. L. (2002). Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 4906-4914.
- Abd-Alla M.H. (1994). Solubilization of rock phosphates by Rhizobium and Bradyrhizobium. *Folia Microbiology*, 39: 53-56.
- Abreu-Tarazi M. F., Navarrete A. A., Andreote F. D., Almeida C. V., Tsai S. M. & Almeida M. (2010). Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26: 555-560.
- Acebo-Guerrero Y., Hernandez-Rodriguez A., Heydrich-Perez M., EJJaziri M. & Hernandez-Lauzardo A. N. (2011). Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. *Fruits*, 67: 41- 48.
- Acebo-Guerrero Y., Hernandez-Rodriguez A., Vandeputte O., Miguelez-Sierra Y., Heydrich-Perez M., Ye L., Cornelis P., Bertin P. & El Jaziri M. (2015). Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). *Journal of Applied Microbiology*, 119: 1112-1126.
- Adejumo T.O. & Orole O.O. (2010). Effect of pH and moisture content on endophytic colonization of maize roots. *Scientific Research and Essays*, 5: 1655-1661.
- Ai C., Liang G., Sun J., Wang X. & Zhou W. (2012). Responses of extracellular enzyme activities and microbial community in both the rhizosphere and bulk soil to long-term fertilization practices in a fluvo-aquic soil. *Geoderma*, 173-174: 330-338.
- Akrofi A.Y., Appiah A. A. & Opoku I. Y. (2003). Management of *Phytophthora* pod rot disease on cocoa farms in Ghana. *Crop Protection*, 22: 469-477.
- Akrofi. A.Y. (2015). *Phytophthora megakarya*: A Review on Its Status as a Pathogen on Cacao in West Africa. *African Crop Science Journal*, 23(1): 67-87.
- Akrofi A. Y., Terlabie J. L., Amoako-Attah I & Asare E. K. (2017). Isolation and characterization of bacteria from different cacao progenies and their antagonistic activity against the black pod disease pathogen, *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124: 143-152.
- Aleksandrov V. G., Blagodyr R. N. & Ilev I.P. (1967). Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 29: 111-114.
- Alexander F., Arendsen M., Soliman Q. & Stephen W. R. (1999). Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. *American Society for Microbiology*, 181(5): 1489-1495.
- Ali S. S., Shao J., Lary D. J., Strem M. D., Meinhardt L. W. & Bailey B. A. (2017). *Phytophthora megakarya* and *P. palmivora*, Causal Agents of Black Pod Rot, Induce Similar Plant Defense Responses Late during Infection of Susceptible Cacao Pods. *Frontiers Plants Sciences*, 8(169): 1-18.
- Allaire M. (2005). Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d’antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Mémoire .de master en science de l’alimentation et agriculture, Université Laval de Quebec, 90p.

- Alsultan W., Vadamalai G., Khairulmazmi A., Saud H.M., Al-Sadi A.M., Rashed O., Jaaffar A. K.M. & Naseh. A. (2019). Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora palmivora* causing black pod of cocoa in Malaysia. *European Journal of Plant Pathology*, 155: 1077-1091.
- Amadou, H. B. (2003). Mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali. Sols et génie agroalimentaire. Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'Alimentation, Université Laval Québec, Canada, 150 p.
- Anderson I. C. & Cairney J. W. G. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6: 769-779.
- Andrés-Barrao C., Benagli C., Chappuis M., Ortega Pérez R., Tonolla M. & Barja F. (2013). Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (2): 75-81.
- Andriamafana H.H., Mong Y., Andriambelason O., Ravonizafy C., Raherimandimby M. & Rasolomampianina R. (2018). Isolation and Identification of Heavy Metals and Antibiotics Resistant Strains from Antananarivo Dumpsite, Madagascar. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(3): 71-78.
- Aneja K. R. (2006). Experiments in Microbiology, *Plant Pathology and Biotechnology*. 4th Edition. New Delhi: 245-275.
- Angraini E., Mubarik N. R. & Widyastu R. (2016). Study of potassium solubilizing bacteria from limestone mining area in Palimanan, Cirebon Quarry. *Malaysian Journal of Microbiology*, 12(1): 62-68.
- Appert J. & Deuse J. (1982). Les ravageurs des cultures vivrières et maraîchères sous les tropiques. Techniques agricoles et production tropicales, *Maisonneuve et Larose*, Paris, France. 421p.
- Archana D., Nandish M., Savalagi V. & Alagawadi A. (2013). Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. *BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sciences*, 10: 248-257.
- Ariffuzzaman M., Khatun M. R. & Rahman H. (2010). Isolation and screening of actinomycetes from sundarbans soil for antibacterial activity. *African of Journal. Biotechnol.* 9: 4615- 4619.
- Ashraf M., Athar H. R., Harris P. & Kwon T. R. (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, 97: 45-110.
- Assa A., Asriati D. W., Indriana D. & Sampebarra A. L. (2019). Mineral contents in fermented bean shells of Forastero-cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 355: 1-6.
- Assiri AA, Kacou EA, Assi FA, Ekra S, Dji KF, Couloud JY, Yapo AR (2012). Rentabilité économique des techniques de réhabilitation et de replantation des vieux vergers de cacaoyers (*Theobroma cacao* L.) en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal and Plant Science*, 14 (2): 939-1951.
- Assiri A. A., Konan A., N'guessan K. F., Kebe B. I., Kassin K. E., Couloud J. Y., Yoro G. R. & Yao-Kouame A. (2015). Comparaison de deux techniques de replantation cacaoyère sur antécédents non-forestiers en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal and Plant Science*, 23(4): 365-378.

- Athalye M., Lacey J., Goodfellow, M. (1985). Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *Journal Applied. Bacteriology*, 51: 289-291.
- Attard A., Gourgues M., Galiana E., Panabieres F., Ponchet M. & Keller H. (2008). Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda de Haan). *Journal of Plant Physiology*, 165: 83-94.
- Babacauh K. D. (1980). Structure et dynamique des populations de *Phytophthora* sp. Parasite du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Paris-Sud, centre d'Orsay, France, 153 p.
- Babu A. G., Kim J. D., Oh B. T. (2013). Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. *Journal of Hazardous Materials*, 250: 477-483.
- Bailey B. A., Ali. S. S. & Meinhardt L.W. (2016). *Phytophthora megakarya*, a Causal Agent of Black Pod Rot in Africa. In: Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters. Bryan A.B. & Meinhardt L.W. (Editors). *Springer International Publishing, Switzerland*: 267-306.
- Bakhshandeh E., Pirdashti H., Lendeh K. S. (2017). Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. *Ecological Engineering*, 103:164-169.
- Baldauf S. L. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution*, 46(3): 263-273.
- Baghya M., Nagaraju K., Biradar P. B. J., Santhosh G. P. & Gundappago R. C. (2019). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from Nodule, Root and Seeds of Greengram (*Vigna radiata* L.). *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, 7(4): 319-328.
- Baker, R. (1987). Mycoparasitism: ecology and physiology. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 9(4), 370–379.
- Baliah N T., Pandiarajan G. & Kumar B. M. (2016). Isolation, Identification and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from Different Crop Soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Tropical Ecology*, 57: 465-474.
- Banas D. & Latas J. C. (2006). Nitrates. In: The White Paper pollutants habitat growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(1): 204-210.
- Barau J., Grandis A., Carvalho V. M., Teixeira G. S., Zapparoli G. H., do Rio M. C., Rincones J., Buckeridge, M. S., & Pereira G. A. (2015). Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches' broom disease of cacao. *Journal of Experimental Botany*, 66, 1325-1337.
- Barea I. M., Pozo M. J., Azcon R. & Azcon-Aguilar C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56 (417): 1761- 1778.
- Bashan Y., Puente M. E., Rodriguez-Mendoza M. N., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R. & Pedrin S. (1995). Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1938-1945.

- Basta T., Buerger S. & Stolz A. (2005). Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology*, 151(6) : 2025-2035.
- Bastide P. (2007). Le Cacao. Atlas de l'intégration régionale en Afrique de l'Ouest, série économie. Chapitre In : Atlas de l'intégration régionale en Afrique de l'Ouest, série économie, Chapter: Le cacao, *Publisher: CEDEAO-CSAO/OCDE*, Editors: CEDEAO, CSAO/OCDE : 1-16.
- Bayer C. & Kubitzki K. (2003). Malvaceae. In: The Families and Genera of Vascular Plants, vol. V, Flowering Plants, and Dicotyledons: Expanded Caryophyllales, Capparales and Malvales. Kubitzki K. & Bayer C. (Editors.), *Springer, Berlin*: 225-311.
- Belay Z. & Assefa F. (2011). Symbiotic and phenotypic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from Northern Gondar, Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 10(21): 4372-4379.
- Bell-Perkins L. J. & Lynch J. M. (2002). Rhizosphere microbiology. In: Encyclopedia of environmental microbiology. Bitton G. & Wiley A. (Editors). *Interscience Publication, Canada*: 2713-2728.
- Bengtsson T. (2013). Boosting Potato Defence against Late Blight: A Study from Field to Molecule. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae*, 58: 80p.
- Berrada H. & Fikri-Benbrahim K. (2014). Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *British Microbiology Research Journal*, 4(6): 616-639.
- Bertron. A., Alquier B. E.M., Jacquemet N., Kassim C., Sablayrolles C., Albasi C., Basseguy R., Strehaiano P., Vignoles M., Albrecht A. & Escadeillas G. (2013). Catalyse biotique et abiotique de la réduction des nitrates en milieu alcalin dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs. *Matériaux & Techniques*, 101 (1): 1-10.
- Bever J. D., Platt T. G. & Morton E. R. (2012). Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual Review of Microbiology*, 66: 265-283.
- Blackwell, E. (1949). Terminology in *Phytophthora*. *Mycological Papers*, 30(1): 1-24.
- Blair J. E., Coffey M. D., Park S.-Y., Geiser D. M. & Kang, S. (2008). A Multilocus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 266-277.
- Bowers J. H & Tondje P. R. (2006). Screening biocontrol candidates for *Phytophthora megakarya* using the leaf disk test. In: Tondje P.R., Hebbar P.K., Samuels G.J., Bowers J.H., Evans H.C., Holmes A K., Onguene N.A. & Foko J. (Editors). Microbial biocontrol methods for *Phytophthora megakarya* cacao black pod disease in Africa. 183p.
- Brasier C. M. & Hansen E. M. (1992). Evolutionary biology; Part II: Phylogeny, Speciation and Population Structure. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 173-200.
- Braudeau J. (1969). Le cacaoyer. Techniques agricoles et productions tropicales, *Maisonneuve et Larose*, Paris, France. 304p.

- Brusamarello-Santos, L. C. C., Pacheco, F., Aljanabi, S. M. M., Monteiro, R. A., Cruz, L. M., Baura, V. A., Pedrosa, F. O., Souza, E. M. et Wassem, R. (2012). Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil*, 356: 113-125.
- Burki F. (2014). The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5): 1-19.
- Cappuccino J.C. & Sherman N. (1992). Negative staining. In: Cappuccino J. C., Sherman N, editors. *Microbiology: A Laboratory Manual. 3rd edition*. Redwood City, Calif, USA: Benjamin/Cummings. 125-179.
- Carip C., Salavert M.-H. & Tandeau A. (2008). Microbiologie, hygiène: bases microbiologiques de la diététique. *Etudes rurales*, 340 p.
- Cathelin J. (2016). Posters_biocontrole ensaia 08/02/2016_biocontrôle, 1p.
- CCC (Conseil Café-Cacao). (2014). Rapport de la session. Plateforme de partenariat public-privé de la filière café-cacao troisième session plénière / Hôtel Du Golf, Abidjan. Côte d'Ivoire, 14p.
- Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J., Bâ A., Gillis M., De Lajudie P. & Dreyfus B. (2000). Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5437-5447.
- Chaudhry V., Sharma S., Bansal K. & Patil P.B. (2017). Glimpse into the Genomes of Rice Endophytic Bacteria: Diversity and Distribution of Firmicutes. *Front. Microbiol.* 7: 1-5.
- Chen M.-H., Sheu S.-Y., James E. K., Young C.-C. & Chen W.-M. (2013). *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 3755-3761.
- Chi F., Schi S. H., Cheng H. P., Jing Y. X., Yanni. Y. G. & Dazzo F.B. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7271-7278.
- Cinnadurai C., Gopalaswamy G. & Balachandar D. (2013). Diversity of cultivable Azotobacter in the semi-arid alfisol receiving long-term organic and inorganic nutrient amendments. *Annals of Microbiology*, 8p.
- Cleenwerck I., De Wachter M., González A., De Vuyst L. & De Vos P. (2009). Differentiation of species of the family Acetobacteraceae by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(7): 1771-1786.
- Clement C.R., de Cristo-Araújo M., d'Eeckenbrugge G.C., Pereira A. A. & Picanço-Rodrigues D. (2010). Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. *Diversity*, 2: 72-106.
- Collins D.P. & Jacobsen B.J. (2003). Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Biological Control*, 26(2): 153-161.
- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. & Barka E.A. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1685- 1693.

- Compant S., Clément C. & Sessitsch A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669-678.
- Cook R.J. & Baker K.F. (1984). The nature and practice of biological control of plant pathogens. *The American phytopathological society*, st Paul, Minnesota. 539 p.
- Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Wagels G., & Brasier C. M. (2000). A Molecular Phylogeny of Phytophthora and Related Oomycetes, *Fungal Genetics and Biology*, 30: 17-32.
- Coulibaly K., Kebe I.B., Koffi N.K., Mpika J. & Kone D. (2013). Caractérisation des isolats de *Phytophthora* spp. du verger cacaoyers de Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Bioscience*, 70: 5567-5579.
- Coulibaly K. (2014). Étude de la structure des populations de *Phytophthora* spp, agent de la pourriture brune des cabosses de cacaoyers (*Theobroma cacao* L.) en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat en Pathologie et Physiologie Végétales. Université Félix Houphouët-Boigny. Abidjan, Côte d'Ivoire, 190p.
- Coulibaly K., Kébé B.I., Aka A.R., Kouakou K., N'Guessan W.P., Tahi G.M., Kassin K.E., Guiraud S.B., Assi M.E., Koné B. & N'Guessan K.F. (2017). Bien lutter contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer en Côte d'Ivoire. Fiche technique cacaoyer n° 6. Centre National De Recherche Agronomique (CNRA), 2p.
- Coulibaly K., Aka R. A., Camara B., Kassin E., Kouakou K., Kébé B. I., Koffi N. K., Tahi M. G., Walet N. P., Guiraud S. B., Assi M. E., Kone B., N'Guessan K. F, Koné D. (2018). Molecular Identification of *Phytophthora palmivora* in the Cocoa Tree Orchard of Côte d'Ivoire and Assessment of the Quantitative Component of Pathogenicity. *Internationale journal de science*, 7 (8): 7-15.
- Chaouch S. (2017). Expérimentation agricole et analyse des données (Dispositifs expérimentaux et modes d'analyse). Module, Expérimentation et analyse des données, Département de Sciences agronomiques, Spécialité : Protection de la ressource Sol eau et environnement, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algeria, 28p.
- Crowder D.W. & Harwood J. D. (2014). Promoting biological control in a rapidly changing world. *Biological Control*, 75: 1-7.
- Curtis T.P., Sloam W. T. & Scannell J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 10494-10499.
- Davidson E.H. (2002). A genomic regulatory network for development. *American association for the advancement of science*, 295(5560): 1669-1678.
- de Abreu C.S., Figueiredo J.E.F., Oliveira C.A., dos Santos V.L., Gomes E.A., Ribeiro V.P., Barros B.A., Lana U.G.P. & Marrie I.E. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, 16 (1): 1-13.
- de Melo Pereira G.V., Magalhães K.T., Souza T.P. & Schwan R.F. (2012). A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. *Microb Ecol, Springer*, 63: 405-417.

- de Souza J.T., de Boer M., de Waard P., van Beek T. A. & Raaijmakers J. M. (2003). Biochemical, Genetic, and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environ Microbiology*, 69: 7161-7172.
- de Vallavielle C. (1983). Contribution A l'étude Des Relations Entre Agrumes et *Phytophthora* Sp. Thèse De Doctorat 3ème Cycle. Université Paris Sud Centre D'orsay. 100p.
- Deberdt P., Mfegue C.V., Tondje P.R., Bon M.C., Ducamp M., Hurard C., Begoude B.A.D., Ndoumbe-Nkeng M., Hebbar P.K. & Cilas C. (2008). Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *Biological Control*, 44 : 149-159.
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. France. 476p.
- Demol J. (2002). L'amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. *Ed. Presses Agronomiques Gembloux*. 560 p.
- Deravel J., Krier F. & Jacques P. (2014). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 18(2): 220-232.
- Desjardins, P.R., Zentmyer, G.A., Reynold, D.A. (1969). Electron microscopic observations of the flagellar hairs of *Phytophthora palmivora* zoospores. *Canadian Journal of Botany*, 47:1077 -1079.
- Dick M.W. (2001). Straminipilous fungi: systematics of the peronosporomycetes, including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids, and similar organisms, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 670 p.
- Diggle S.P., Griffin A.S., Campbell G.S. & West S. A. (2007). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450: 411-414.
- Divakar G., Sameer R.S. & Bapuji M. (2018). Screening of Multi-Metal Tolerant Halophilic Bacteria for Heavy Metal Remediation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 7(10): 2062-2076.
- Dixit S., Dubey R. C. & Seth P. K. (2014). Characterization of Plant growth Promoting Endophytic Bacteria Isolated from *Lens culinaris* medik with antagonistic Potential against *Fusarium Oxysporum*. *International Journal of Bioinformatics and Biological Sciences*, 2 (1&2): 95-109.
- Döbereiner J., Marriel I.E. & Nery M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum*. *Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology*, 22: 1464-1473.
- Dong X., Lv L., Wang W., Liu Y., Yin C., Xu Q., Yan H., Fu J. & Liu X. (2019). Differences in Distribution of Potassium-Solubilizing Bacteria in Forest and Plantation Soils in Myanmar. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(700): 1-14.
- DPVCQ. (2004). Charte de gestion de la direction de la protection des végétaux, du contrôle et de la qualité (DPVCQ), 31p.
- Dufumier M. (2016). L'adaptation de la cacaoculture ivoirienne au dérèglement climatique : L'agroécologie pourrait-elle être une solution ? *Plate-Forme pour le Commerce Equitable*, 16 p.

- Duhoux E. & Nicole M. (2004). Atlas de biologie végétale. Associations et interactions chez les plantes. Dunod (Eds), Paris. France, 157p.
- Duniway J. M. (1983). Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. In Erwin D.C., Bartnickigarcia S & Tsao P.H. (editors) *Phytophthora: it's Biology Taxonomy, Ecology and pathology*. American phytopathological Society, St. Paul, Minnesota: 175-187.
- Dzahini-Obiatey H., Ameyaw G.A., Ollennu L.A. (2006). Control of cocoa swollen shoot disease by eradicating infected trees in Ghana: A survey of treated and replanted areas. *Crop Protection*, 25: 647-652.
- Efombagn, M. I. B., Sounigo, O., Nyasse, S., Manzanares-Dauleux, M., Cilas, C., Eskes, M. A. B. & Kolesnikova, A. (2006). Genetic diversity in cocoa germplasm of southern Cameroon revealed by simple sequences repeat (SSRS) markers. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1441-1449.
- Efombagn M.I.B., Nyassé S., Biéysse D. & Sounigo O. (2013). Analysis of the resistance to *Phytophthora* pod rot within local selections of cacao (*Theobroma cacao* L.) for breeding purpose in Cameroon. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 5(6): 111-119.
- Elad Y. (1995). Mycoparasitisme (Chapter 18). In : Kohomoto K., Singh U. S., Singh R. P. (Editors) Pathogenesis and hosts specificity in plant diseases. *Eukaryotes*, volume II: 289-307.
- El-Hilali I. (2006). La symbiose *Rhizobium*-Lupin : Biodiversité des micro-symbiotes et mise en évidence d'une multi infection nodulaire chez *Lupinus luteus*. Thèse Doctorat, Université Mohammed V. Agdal, Rabat, Maroc, 189p.
- Elsen A., Gervacio D., Swennen R., & De Waele D. (2008). AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* spp.: a systemic effect. *Mycorrhiza*, 18: 251-256.
- El Sheikh E.A.E. & Wood M. (1990). Response of chickpea and soybean Rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil Biology and Biochemistry*. 21: 889-895.
- End M.J., Daymond A.J. & Hadley P. (2014). Guide technique pour les transferts sécurisés de matériel génétique de cacaoyer. Révision des Directives techniques FAO/IPGRI No. 20. Global Cacao Genetic Resources Network (CacaoNet), Biodiversity International, Montpellier, France. 14p.
- Engelhard M., Hurek T. & Reinhold-Hurek B. (2000). Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environmental Microbiology*, 2: 131-41.
- Erwin D.C. & Ribeiro O.K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. *The American Phytopathological Society*: 248-256.
- Etaware P.M. & Adedeji A.R., (2019). Assessment of black pod disease outbreak in Southwest, Nigeria. *Journal of Agricultural Research Advances*, 1 (02): 1-25.
- Eugenia E. Chaia L., Wall G. & Huss-Danell K. (2011). Life in soil by the actinorhizal root module endophyte *Frankia*: a review. *Symbiosis*, 51(3): 201-226.
- Falcão L.L., Silva-Werneck J.O., Vilarinho B.R., da Silva J.P., Pomella A.W.V. & Marcellino L.H. (2014). Antimicrobial and plant growth-promoting properties of the cacao endophyte *Bacillus subtilis* ALB629. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 1584-1592.

- Fankem, H., Nwaga, D., Deube, A., Dieng, L., Merbach, W. & Etoa, F. X. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal Biotechnology*, 5: 2450-2460.
- Faugier A. (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires «the rare biosphere». Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Centrale de Lyon, France, 175p.
- Figueiredo M.V. B., Burity H.A., Martinez C.R. & Chanway C.P. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:1187-1193.
- Flynn D.F.B., Gogol-Prokurat M., Nogeire T., Molinari N., Richers B.T., Lin, B.B., Simpson, N., Mayfield M.M. & DeClerck F. (2009). Loss of functional diversity under land use intensification across multiple taxa. *Ecology Letters*, 12: 22-33.
- Fravel D.R., Rhodes D.J. & Larkin R.P. (1999). Production and commercialization of biocontrol products. In: *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*, edited by R. Albajes, M. L. Gullino, J. C. van Lenteren and Y. e. Elad: Dordrecht: Kluwer: 377-393.
- Friedel H.-A., Claudia H., Irene K., Pedro M. & Mara M. (2016). Renforcer la compétitivité de la production de cacao et augmenter le revenu des producteurs de cacao en Afrique de l'Ouest et en Afrique central, 84p.
- Gamfeldt L., Hillebrand H. & Jonsson P.R. (2008). Multiple functions increase the importance of biodiversity for overall ecosystem functioning. *Ecology*, 89: 1223-1231.
- García-Fraile P., Menéndez E. & Rivas R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Press*, 2(3): 183-205.
- Garrity G.M., Leventhal J. & Lilburn T.G. (2005). Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Release 6.0. *Springer*, 399p.
- Geisseler D. & Scow K.M. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms- A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 75: 54-63.
- GenoSol, 2015. Mode opératoire : Méthode de prélèvement d'échantillons de sol, Version (0 4), 6 p.
- Gholami A., Biyari A., Gholipour M & Rahmani A. H. (2012). Growth Promotion of Maize (*Zea mays* L.) by Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria under Field Conditions, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(9): 1263-1272.
- Gholami A., Shahsavani S. & Nezarat S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Biology and Life Sciences*, 1: 35-40.
- Ghoul M. & Mitri S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*, 24: 833-845.
- Gillis M., Kerster K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt R.M., Stephan M.P., Teixeira K.R.S. & Döbereiner J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. A nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 39: 361-364.

- Giyanto., Wahyuno D., Wartono., & Arifin F.A. (2020). Exploration of endophytic bacteria for inducing plant growth and diseases resistance to vascular streak dieback (*Ceratobasidium theobromae*) on cacao. IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*, 418: 1-10.
- Glick B.R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 28: 367-374.
- Gockowski J., Tchatat M., Dondjang J.-P., Hietet G. & Fouda T. (2010). An empirical analysis of the biodiversity and economic returns to cacao agroforests in Southern Cameroon. *Journal of Sustainable Forestry*, 29: 637-670.
- Golubyatnikov L.L., Mokhov I.I. & Eliseev A.V. (2013). Nitrogen Cycle in the Earth Climatic System and Its Modeling. *Atmospheric and Oceanic Physics*, 49(3): 229-243.
- Gomes E.A., Silva U. de C., Marriel I.E., Paiva C.A.O. & Lana U.G. de P. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 13: 69-81.
- Gomes R.J., Borges M. de F., Rosa Fr.M., Castro-Gómez R.J. H. & Aparecida W. (2018). Spinosa1Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2): 139-151.
- Gomez K.A. & Gomez A.A. (1984). Statistical Procedures for Agricultural Research. 2nd ed. Chapter 2. New York: John Wiley & Sons: 7-83.
- González V., Santamaría R. I., Bustos P., Pérez-Carrascal O. M., Vinuesa P., Juárez S., Martínez-Flores I., Cevallos M. Á., Brom S., Martínez-Romero E. & Romero D. (2019). Phylogenomic *Rhizobium* Species Are Structured by a Continuum of Diversity and Genomic Clusters. *Frontiers in Microbiology*, 10(910): 1-15.
- Govarthanan M., Park S.H., Park Y.J., Myung H., Krishnamurthy R.R., Lee S.H., Lovanh N., Kamala-Kannan S. & Oh B.T. (2015). Lead biotransformation potential of allochthonous *Bacillus* sp. SKK11 with sesame oil cake extract in mine soil. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5: 54564-54570.
- Govarthanan M., Mythili R., Selvankumar T., Kamala-Kannan S., Rajasekar A., Chang Y.-C. (2016). Bioremediation of heavy metals using an endophytic bacterium *Paenibacillus* sp. RM isolated from the roots of *Tridax procumbens*. *3 Biotech*, 6(242): 1-7.
- Govindarajan M., Balandreau J., Kwon S.W., Weon, H.Y. & Lakshminarasimhan C. (2008). Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. *Microbial Ecology*, 55: 21-37.
- Graham P.H. & Parker C.A. (1964). Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. *Plant Soil*, 20: 383-396.
- Gramlich A., Tandy S., Andres C., Chincheros P.J., Armengot L., Schneider M. & Schulin R. (2016). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management, *Science of the Total Environment*: 1-10.
- Grassi D., Desideri G., & Ferri C. (2013). Protective effects of dark chocolate on endothelial function and diabetes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16: 662-668.

- Gray E.J. & Smith D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 395-412.
- Grube M., Schmid F. & Berg G. (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, 115: 978-986.
- Gtari M., Tisa L.S., Normand P. (2014). Diversity of *Frankia* strains, actinobacterial symbionts of actinorhizal plants. In: Aroca R, editor. Symbiotic Endophytes. *Berlin Heidelberg: Springer-Verlag*: 123-148.
- Guest D.I., Anderson R.D., Foard, H.J., Phillips D., Worboys S. & Middleton, R.M. (1994). Long-term control of *Phytophthora* diseases of cocoa using trunk-injected phosphonate. *Plant Pathology*, 43: 479-492.
- Guest D. (2007). Black Pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*, 97(12): 1650-1653.
- Guest D.I. & Keane P. (2007). Vascular-streak dieback: A new encounter disease of cacao in Papua New Guinea and Southeast Asia caused by the obligate basidiomycete *Oncobasidium theobromae*. *Phytopathology*, 97(12): 1654-1657.
- Guest D.I. & Keane P. (2018). Cacao diseases: vascular-streak dieback. Chapter taken from: Umaharan, P. (Editors), Achieving sustainable cultivation of cocoa, *Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge*, 18p.
- Gupta A., Gopal M. & Tilak K. V. (2000). Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38: 856-862.
- Gupta G, Parihar S.S., Ahirwar N.K., Snehi S.K. & Singh V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7: 096-102.
- Gupta. R., Mohapatra P.G.H., Goswami V.K. & Chauhan B. (2003). Microbial alphaamylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38:1599-1616.
- Gurikar C., Naik, M.K. & Sreenivasa M.Y. (2016). *Azotobacter*: PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation. In: Microbial inoculants in Sustainable Agricultural Productivity, *Springer India, New Delhi*: 229-244.
- Gusmão-Lima A. I., Figueira E. M.D.A.P. & Pereira S.I.A. (2005). Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Canadian journal of microbiology*, 51(1): 7-14.
- Gutiérrez-López N., Ovando-Medina I., Salvador-Figueroa M., Molina-Freaner F., Avendaño-Arrazate C. H. & Vázquez-Ovando A. (2016). Unique haplotypes of cacao trees as revealed by trnH-psbA chloroplast DNA, *PeerJ*, 4: 1-14.
- Haas D. & Défago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonas fluorescent*. *Natural Review of Microbiology*, 1129p.
- Habibi S., Djedidi S., Prongjunthuek K., Mortuza M.D.F., Ohkama-Ohtsu N., Sekimoto H. & Yokoyoma T. (2014). Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant Soil*, 379: 51-66.

- Haiyambo D.H. & Chimwamurombe P.M. (2018). Isolation of the *Azospirillum* Species from the Rhizosphere of the Leguminous *Bauhinia petersiana* in North Eastern Namibia, 11(4): 347 -353.
- Hallmann J., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J.W., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F. & Kloepper J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914.
- Hamzah A., Zubir I., Ross E.E.R. & Aqma W.S. (2017). Antagonistic effect and plant growth hormone produced by endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* LKM-UL isolated from cocoa plant. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 7: 169-176.
- Hanada R.E., Pomella A.W.V., Soberanis W., Loguercio L.L., & Pereira, J.O. (2009). Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control*, 50: 143-149.
- Hanada R.E., Pomella A.W.V., Costa H.S., Bezerra J.L., Loguercio L.L. & Pereira J.O. (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*, 114: 901-910.
- Harman G. (2011). *Trichoderma* not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39: 103-108.
- Hassan A.A., Mohyla H., Kanbar T., Alber J., Lämmler C., Abdulmawjood A. & Weiss R. (2008). Molecular identification of *Arcanobacterium bialowiezense* and *Arcanobacterium bonasi* based on 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequences. *Veterinary microbiology*, 130(3-4): 410-414.
- Henderson J.S., Joyce R.A., Hall G.R., Hurst W.J. & McGovern P.E. (2007). Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 18937-18940.
- Herman A., Jürgen P. & Pérez V.D. (2010). Growth and production of cacao. Soils, plant Growth and crop production .Vol III.10p.
- Hervé M. (2016). Aide-mémoire de statistique appliquée à la biologie : Construire son étude et analyser les résultats à l'aide du logiciel R, 203p.
- Heydari S, Moghadam P.R. & Arab S.M. (2008). Hydrogen Cyanide Production Ability by *Pseudomonas fluorescence* Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. In Proceedings "Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development": Tropentag, Hohenheim. October 2008: 7-9
- Hjeljord L.G., Stensvand A. & Tronsmo A. (2000). Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biological Control*, 19(2):149-160.
- Horner-Devine M. C., Leibold M. A., Smith V. H. & Bohannan, B. J. M. (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6: 613-622.
- ICCO (International Cocoa & Chocolate Organisation). (2000). Célébration du cacao, 115 p.
- ICCO. (2015). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLI, N0 3, Cocoa year 2014 / 2015.1p.
- ICCO. (2019). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics Vol. XLV, No.3, Cocoa year 2018/19. 1p.

- Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Welzel W.W. & Seissitsch A. (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2667-2677.
- Ikeda A.C., Bassani L. L., Adamoski D., Stringari D., Cordeiro V.K., Glienke C., Galli-Terasawa L.V., Steffens M.B.R. & Hungria M. (2013). Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microb Ecol*, 65: 154-160.
- Iniguez A.L., Dong Y. & Triplett E. W. (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(10): 1078-1085.
- Iwaro A.D., Butler D.R. & Eskes A.B. (2006). Sources of resistance to *Phytophthora* pod rot at the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 99 -109.
- Jaaffar A.K.M. (2004). Antagonistic activities of epiphytic bacteria on black pod disease of cocoa. Master Thesis, University Putra Malaysia, Selangor, Malaysia, 25p.
- Jeffrey L.S. (2008). Isolation, characterization and identification of Actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 7: 3697-3702.
- Jha P.N., Gupta G., Jha P. & Methrotra R. (2013). Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. *Greener Journal of Agricultural Sciences*, 3: 73-84.
- Joe M.M., Devara S., Benson A., Sa, T. (2016). Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum &Thonn: Evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plant*, 3: 71-77.
- Jonathan R., Gaiero C. A., Mccall K. A., Thompson N. J., Day A. S. B. & Kari E. D. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9): 1738-1750.
- Joo G. J., Kang S.M., Hamayun M., Kim N.C.I., Shin D.H. & Lee I.J. (2009). *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *Journal of Microbiology*, 47: 167-171.
- Jordan D.C. (1984). Family III, Rhizobiaceae, Conn. 1938. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I, ed. Kreig, N. R. and Holt, J.G: 234-244.
- Jorquera M.A., Hernandez M.T., Rengel Z., Marschner P., Mora M.D. (2008). Isolation of culturable phosphor bacteria with both phytate-mineralization and phosphatesolubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 1025-1034.
- Kaioua A. (2015). Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isolées des sols rhizosphériques. Identification de souches représentatives. Master, Science de la Nature et la Vie, Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Micro-organismes Université des Frères Mentouri Constantine (Algerie), 92 p.
- Kareem O.I. (2016). Cocoa exports' effects of the European Union's SPS measures. *International Journal of Sustainable Economy*, 8(1): 76-89.

- Karpagam T. & Nagalakshmi P.K. (2014). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3: 601-614.
- Kassin K.E., Koko L., N'goran K.E., Yao-Kouame A. & Yoro G.R. (2012). Sols favorables à la cacaoculture au centre-ouest de la Côte d'Ivoire dans un contexte d'assèchement climatique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(3): 1148-1157.
- Kassin E., Snoeck D., Nguessan J.-C., Yao-Kouamé A. & Camara, M. (2014). Soil Mapping Project Final Report. CNRA, Cirad, Idh, World Cocoa Foundation, Conseil du café-cacao, Côte d'Ivoire, 18 p.
- Katz D.L., Doughty K. & Ali A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 15: 2779-2811.
- Kébé I.B., Mpika J., N'guéssan K.F., Hebbar P.K., Samuels G.S. & Ake S. (2009). Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature*, 6 (1): 71-82.
- Kehl-Fie T.E. & Skaar E.P. (2010). Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14: 218-224.
- Keho Y., Diallo S.S. & Agkpo J.L. (2008). "Modélisation de la Production Cacaoyère en Côte d'Ivoire", IITA/STCP, 10p.
- Kelly P.L., Reeder R., Rhodes S. & Edwards N. (2009). First confirmed report of witches' broom caused by *Moniliophthora perniciosa* on cacao, *Theobroma cacao*, in Saint Lucia. *Plant Pathology*, 58: 798-798.
- Khaeruni A., Wijayanto T., Darmansyah R.A. & Sutariati G.A.K. (2019). Antagonistic activity of indigenous endophytic bacteria from cocoa plants against *Phytophthora palmivora* Bult the cause of black pod rot disease in cocoa. *Bioscience Research*, 16: 272-280.
- Khan M.S., Ahmad E., Zaidi A. & Oves M. (2012). Functional Aspect of Phosphate Solubilizing Bacteria: Importance in Crop Production, (Chapter 10) *In: Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*, Maheshwari D.K., Meenu S. & Aeron A. (Editors). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2013: 237-263.
- Khan M.S., Zaidi A., Ahemad M., Oves M. & Wani P.A. (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56: 73-98.
- Khan N., Martínez-Hidalgo P., Ice T. A., Maymon M., Humm E. A., Nejat N., Sanders E. R., Kaplan D. & Hirsch A. M. (2018). Antifungal Activity of *Bacillus* Species against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9: 23-63.
- Khawilkar S.A. & Ramteke J.R. (1993). Response of applied K in cereals in Maharashtra. *Agriculture*: 84-96.
- Koko L. (2014). Teractiv cacao as a new fertilizer based reactive phosphate rock for cocoa productivity in Côte d'Ivoire: A participatory approach to update fertilization recommendation. *Procedia Engineering*, 83: 348-353.

- Konam J. & Guest D. (2002). Leaf litter mulch reduces the survival of *Phytophthora palmivora* under cocoa trees in Papua New Guinea. *Australasian Plant Pathology*, 31(4): 381-383.
- Konaté I., Koulibaly A., Koffi M., Sorouri A., Berraho E.B. & Filali-Maltouf A. (2014 a). Phenotypic variations of endophytic bacteria associated with carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *American Journal of Lifes Sciences*, 2: 325-332.
- Konaté I., Koulibaly A., Coulibaly I. & Berraho E.B. (2014 b) Phosphate Solubilizing of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Associative Bacteria Analyzed by Molecular Technique ARDRA. *International Journal of Science and Research*, 3: 473-479.
- Konaté I., Amani K., Koffi M., Guei R.N., K., Ouattara A., Tonessia C.D., Filali-Maltouf A., Akaffou D.S. (2015 a). Effect of herbicides on Rhizobacteria density in experimental fields and on Bacterial Strains Survival In-Vitro, *International Journal of Current Research*, 7(5): 16361-16365.
- Konaté, I., Ouattara A., Coulibaly B., Guei N. K. R., Amani K., Kouakou I. K., Filali-Maltouf A. & Koffi, M. (2015 b). Phenotypic Diversity of Associative Bacteria Isolated from Roots and Stems of Cacao (*Theobroma cacao*) Tree in Daloa, Côte d'Ivoire. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4: 560-570.
- Koua S.H., Coulibaly N.A.M.-D. & Alloueborand W.A.M. (2018). Caractérisation des vergers et des maladies de cacao de la Côte d'Ivoire : cas des départements d'Abengourou, Divo et Soubré. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 35(3): 5706-5714.
- Kouakou B.J., Irie B.Z., Dick E., Nemlin G. & Bomisso L.E. (2013). Caractérisation des techniques de séchage du cacao dans les principales zones de production en Côte d'Ivoire et détermination de leur influence sur la qualité des fèves commercialisées. *Journal of Applied Biosciences*, 64: 4797-4812.
- Kouakou K., Kébé B.I., Kouassi N., Anno A.P., Aké S. & Muller E. (2011). Impact de la maladie virale du swollen shoot du cacaoyer sur la production de cacao en milieu paysan à Bazré (Côte d'Ivoire). *Journal of Applied Biosciences*, 43: 2947-2957.
- Krause A., Julich H., Manker M. & Reinhold-Hurek. (2017). The regulatory Network controlling ethanol-induced expression of alcohol dehydrogenase in the endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(10): 778-785.
- Kroon L.P.N.M., Bakker F.T., van den Bosch G.B.M., Bonants P.J.M. & Flier W.G. (2004). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biotechnology*, 41: 766-782.
- Kucey R.M.N. (1983). Phosphate-Solubilizing Bacteria and Fungi in Various Cultivated and Virgin Alberta Soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 63: 671-678.
- Kumar A., Choudhar C.S., Paswa D. & Kuma R.B. (2014). Sustainable way for enhancing phosphorus efficiency in agricultural soils through phosphate solubilizing microbes. *Asian Journal of Soil Sciences*, 9: 300-310.
- Kumar N., Singh R.K & Mishra S.K. (2010). Isolation and screening of soil actinomycetes as sources of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*, 2: 12-16.

- Lachenaud Ph., Paulin D., Ducamp M. & Thevenin J.-M. (2007). Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Scientia Horticulturae*, 113: 313-321.
- Läderach P., Martinez-Valle A., Schroth G. & Castro N. (2013). Predicting the future climatic suitability for cocoa farming of the world's leading producer countries, Ghana and Côte d'Ivoire. *Climate Change*, 119: 841-854.
- Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A. & Grabovich M. 2010. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12): 2832-2837.
- Leake J., Johnson D., Donnelly D., Muckle G., Boddy L. & Read D. (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1016-1045.
- Leelasuphakul W., Sivanunsakul P. & Phongpaichit S. (2006). Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 990-997.
- Lim S.-R. & Schoenung J. M. (2010). Human health and ecological toxicity potentials due to heavy metal content in waste electronic devices with flat panel displays. *Journal of Hazardous Materials*, 177: 251-259.
- Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D. & Yassin A.F. (2009). *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4): 761-765.
- Lin S.Y., Shen F.T., Young L.S., Zhu Z.L., Chen W.M. & Young C.C. (2012). *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(5): 1185-1190.
- Lin S.Y., Liu Y.C., Hameed A., Hsu Y.H., Lai W. A, Shen F.T & Young C.C. (2013). *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogenfixing species isolated from a fermenter. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(10): 3762-3768.
- Lisdiyanti, P., Kawasak, H., Widyastuti Y., Saon, S., Sek, T., Yamad, Y., Uchimura, T., Komagata K. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 813-818.
- Liu H., Wu X. Q., Ren J. H. & Ye J. R. (2011) Isolation and Identification of Phosphobacteria in Poplar Rhizosphere from Different Regions of China. *Pedosphere*, 21: 90-97.
- Lopez B. R., Bashan Y. & Bacilio M. (2011) Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the Southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology*, 193: 527-541.
- Louise N.W., Séverin T.N., Raymond F., Xavier E.F. & Martine D. (2011). Flavonoïd compounds synthesis by cocoa fruits (*Theobroma cacao* L.) in response to *Phytophthora megakarya* infection. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 7: 335-342.

- Loureiro G. A. H. A., Araujo Q. R., Sodré G. A., Valle R. R., Souza J. O. J., E. Ramos M. L. S., Comerford N. B. & Grierson P. F. (2016). Cacao quality: Highlighting selected attributes, *Food Reviews International*, 33(4): 382-405.
- Lucy M., Reed E & Glick B.R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 1-25.
- Lugtenberg B. & Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541-56.
- Luo P., Han X., Wang Y., Han M., Shi H., Liu N. & Bai H. (2015). Influence of long-term fertilization on soil microbial biomass, dehydrogenase activity, and bacterial and fungal community structure in a brown soil of northeast China, *Ann Microbiol*, 65: 533-542.
- Lupwayi, N.Z., Clayton, G.W., O'Donovan, J.T., Grant, C.A. (2011). Soil microbial response to nitrogen rate and placement and barley seeding rate under no till. *Agronomy Journal*, 10: 1064-1071.
- Lupwayi N.Z., Lafond G.P., Ziadi, N., Grant C.A. (2012). Soil microbial response to nitrogen fertilizer and tillage in barley and corn. *Soil & Tillage Research*. 118: 139-146.
- Lynn T. M., Win H. S., Kyaw E. P., Latt Z. K. & Yu. S. S. (2013). Characterization of phosphate solubilizing and potassium decomposing strains and study on their effects on tomato cultivation. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 3: 959-966.
- Mac Donald, J. D. & Duniway, J. M. (1978). Temperature and water stress effects on sporangium viability and zoospore discharge in *Phytophthora cryptogea* and *P. megasperma*. *Phytopathology*, 68: 1449-1455.
- Macagnan D., Romeiro R.D.S., de Souza J.T. & Pomella A.W. (2006). Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 34: 122-132.
- MacLean R.C. & Gudelj I. (2006). Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. *Nature*, 441: 498-501.
- MacLean R.C. (2007). Short Review: The tragedy of the commons in microbial populations: insights from theoretical, comparative and experimental studies. *Heredity*: 1-7.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S. & Sa T. (2007). Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato *Lycopersicon esculentum* L. *Chemosphere*, 69: 220-228.
- Maktouf S. (2013). Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus* Production sur milieu solide et caractérisation. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse, spécialité : Ingénieries Microbienne et Enzymatique, France, 147p.
- Maqsood M., Shehzad M., Wahid A., Butt A.A. (2013). Improving drought tolerance in maize (*Zea mays*) with potassium application in furrow irrigation systems. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(6): 1193-1198.
- Marasco R., Rolli E., Fusi M., Cherif A., Abou-Hadid A., ElBahairy U., Borin S., Sorlini C. & Daffonchio D. (2013). Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *BioMed Research International*, 3: 247-261.

- Maron P.A., Mougél C. & Ranjard L. (2011). Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, 334: 403-411.
- Marques A.S.A., Marchaison A., Gardan L, & Samson R. (2008). BOXPCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 106-115.
- Martin F.N., Abad Z. G., Baici Y. & Ivors K. (2013). Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease*, 96(8): 1080-1103.
- Martins G. (2012). Communautés microbiennes de la baie de raisin : Incidence des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de Doctorat De l'Université Bordeaux, Bordeaux, France, 289p.
- Masanto., Wibowo A., T.Joko., Subandiyah S. & Kageyama K. (2020). Antagonistic potential of endophytic bacteria against *Phytophthora palmivora* causing black pod rot disease on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Indonesia. *Plant Pathology Journal*, 19: 22-41.
- Mashiane A.R., Adeleke R.A., Bezuidenhout C.C. & Chirima G.J. (2018). Community composition and functions of endophytic bacteria of Bt maize. *South African Journal of Science*, 114(7/8): 1-10.
- Maskarinec G., Jacobs S., Shvetsov Y., Boushey C. J., Setiawan V. W., Kolonel L. N., Haiman. C. A. & Le Marchand L. (2018). Intake of cocoa products and risk of type-2 diabetes: the multiethnic cohort. *European Journal of Clinical Nutrition, Springer Nature*: 1-9.
- Mc Neil C.L. (2009). Chocolate in Mesoamerica: a cultural history of cacao. Ed. Cameron L. Mc Neil. 544 p.
- McCarthy C.G.P. & Fitzpatrick D.A. (2019). Phylogenomic reconstruction of the oomycete phylogeny derived from 37 genomes. *mSphere*, 2(2): 1-17.
- McCully M. (2005). The rhizosphere: the key functional unit in plant/soil/microbial interactions in the field. Implications for the understanding of allelopathic effects. In Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy: 21-26 August 2005; Charles Sturt University, Wagga Wagga, NSW, Australia. *International Allelopathy Society*. Edited by Harper J, An M, Wu H, Kent J: 43-49.
- McGowan J., Byrne K.P. & Fitzpatrick D.A. (2019). Comparative Analysis of Oomycete Genome Evolution Using the Oomycete Gene Order Browser (GOGB). *Genome Biology and Evolution*, 11(1): 89-206.
- Meena V.S., Bihari R.M., Jai P.V., Abhinav A., Ashok K., Kangmin K. & Vivek K.B. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81: 340-347.
- Mehnaz S. (2015). *Azospirillum*: A biofertilizer for every crop. In: Arora N.K. (Editors) Plant Microbes Symbiosis. *Applied Facets, Springer India*: 297-314.
- Méjia L.C., Rojas E.I., Maynard Z., Bael S.V., Arnold A.E., Hebbar P., Samuels G.J., Robbins N. & Herre E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46: 4-14.
- Melnick R.L., Suárez C., Bailey B. A. & Backman P.A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57: 236-245.

- Melnick R.L., Zidack N. K., Bailey B.A., Maximova S.N., Gultinan M., Backman P.A. (2008). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control* 46: 46–56.
- Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Araujo W.L. & Raaijmakers J.M. (2007). Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7259-7267.
- Mendoza G.R.A., Martijn ten Hoopen G., Kass D.C.J., SanchezGarita V.A. & Krauss U. (2003). Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biological Control*, 27(2): 210-227.
- Mendoza-Suárez M.A., Geddesa B.A., Sánchez-Cañizares C., Ramírez-González R. H., Kirshhellea C., Jorrina B. & Poolea P. S. (2020). Optimizing *Rhizobium*-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. *Agricultural Sciences*, 117 (18): 9822- 9831.
- Menna P., Barcellos F.G. & Hungria M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of 16S rRNA, ITS, glnII, recA, atpD and dnaK genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2934-2950.
- Mercado-Blanco J. & Bakker P.A.H.M. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* sp. Exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92: 367-389.
- Meulemans. (1989). Les champignons phytopathogenes. In: Traite de pathologie vegetale (Ed. Semai, J.). *Les Presses Agronomiques de Gembloux, Belgique*, 179-195.
- Milošević N., Tintor B., Protić R., Cvijanović G. & Dimitrijević T. (2012 a). Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3): 7352-7357.
- Milošević N.A., Jelena B.M. & Branislava B.T. (2012 b). Mitigating abiotic stress in crop plants by microorganisms. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 123: 17-26.
- Ministere de l’Agriculture et du Developpement Rural. (2018). Rapport final, Programme de transformation de l’agriculture en afrique de l’ouest (PTAAO) plan de gestion des pestes (PGP). 93p.
- Mirza M.S., Mehnaz S., Normand P., Prigent-Combaret C., Moënne-Loccoz Y., Bally R. & Malik, K. A. (2006). Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 163-170.
- Missbah M.E.I., Aujjar N., Belabed A., Dessaux Y. & Filali-Maltouf A. (1996). Characterization of *Rhizobia* isolated from Carob tree (*Ceratonia siliqua*). *Journal of Applied Microbiology*. 80: 165-173.
- Mohammadi K. (2012). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resources Environ*, 2: 80-85.
- Mondego J.M.C., de Toledo Thomazella D.P., Teixeira P.J.P.L. & Pereira G.A.G. (2016). Genomics, Transcriptomics, and Beyond: The Fifteen Years of Cacao’s Witches’ Broom

- Disease Genome Project (Chapiter 6) *in*: Cocoa Diseases. Bryan A. Bailey, Lyndel W. Meinhardt Editors, Beltsville, MD USA: 179-210.
- Monita F., Abreu-Tarazi M. F., Acácio A., Navarrete A. A., Fernando D., Andreote F. D., Cristina V., Almeida V., Siu M. & Tsai S. M. A. (2010). Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 26: 555-560.
- Motamayor J.C., Lachenaud P., da Silva e Mota J.W., Loor R., Kuhn D.N., Brown J.S., & Schnell R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS One*, 3(10): 1-8.
- Mpika J., Kébé I.B., Issali A.E., N’Guessan F.K., Druzhinina S., Komon-Zélazowska M., Kubicek C. P. & Aké S. (2009). Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Côte d’Ivoire. *African Journal of Biotechnology*, 8(20): 5280-5293.
- Mpika J. (2010). Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères et mises en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) en Côte d’Ivoire. Thèse de Doctorat d’Etat. Université de Cocody-Abidjan, 259 p.
- Muller E. (2008). Cacao Swollen Shoot Virus. *In*: Govind R. P, Khurana P. S. M, Sergio L. L, (editors). Characterization, diagnosis and management of plant viruses. *Industrial Crops. Studium Press LLC*: 423-444.
- Murali G., Gupta A. & Air R.V. (2005). Variations in hosting beneficial plant associated microorganisms by root (wilt) diseased and field tolerant coconut palms of west coast tall variety. *Current Science*, 89: 1922-1927.
- Mursyida E., Mubarik N.R., Tjahjoleksono A. (2015). Selection and identification of phosphate-potassium solubilizing Bacteria from the area around the limestone mining in Cirebon Quarry. *Research Journal of Microbiology*, 10 (6): 270-279.
- Muyzer G., de Waal E. C. & Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Muyzer G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 317-322.
- Muzzamal H., Sarwar R., Sajid I. & Hasnain S. (2012). Isolation, identification and screening of endophytic bacteria to biofilm formers. *Pakistan Journal of Zoology*, 44: 249-257.
- Myers R. M., Fischer S.G., Lerman L.S. & Maniatis T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13: 3131-3145.
- N’Goran J.K.A. & Eskes A. (2006). Outline of the CFC/ICCO/IPGRI project achievements. *In*: Eskes Albertus and Efron Yoel (Eds.). Global aroaches to cocoa germplasm utilization and conservation. Final report of the CDC/CCO/IPGRI project on “Cocoa germplasm utilization and conservation: A global approach” (1998-2004). *Amsterdam, CFC*: 11-22.

- Nabti E., Sahnoune M., Ghouli M., Fischer D., Hoffmann A., Rothballer M., Schmid M. & Hartman A. (2010). Restoration of Growth of Durum Wheat (*Triticum durum* var. *Waha*) Under Saline Conditions Due to Inoculation with the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* NH and Extracts of the Marine Alga *Ulva lactuca*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29: 6-22.
- Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L. & Renella G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bunemann E, Oberson A, Frossard E (eds) Phosphorus in action: Biological processes in soil phosphorus cycling. *Soil Biology, Springer, Heidelberg*, 26: 251-244.
- Nautiyal C. S., Bhaduria S., Kumar P., Lal H., Mondal R. & Verma D. (2000). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 291-296.
- Nayadanu D., Akromah R., Adomako B., Dzahini-Obiatey H., Akrofi A.Y., Lowor S.T., & Assuah M.K. (2012). Breeding for Multiple Disease Resistance in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 6(4): 182-194.
- Ndoumbe M.N. (2002). Incidence des facteurs agro-écologiques sur L'épidémiologie de la pourriture brune des fruits du cacaoyer au Cameroun: Contribution à la mise en place d'un modèle D'avertissements agricoles. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon. France, 189p.
- Ndongue D.M.M., Tchana T., Nana W., Techou Z., Petchayo S., Fontem, A. D. & Ten Hoopen G. M. (2012). Effet des traitements du sol sur le developpement de l'epidemie de la pourriture brune (*Phytophthora megakarya*) du cacaoyer au Cameroun. Conference, October 2012, Cameroun, 5p.
- Nyassé S., Cilas C., Herail C. and Blaha G. (1995). Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. *Crop Protection*, 14(8): 657-663.
- Nyassé S., Despreaux D. & Cilas C. (2002). Validity of a leaf inoculation test to assess the resistance to *Phytophthora megakarya* in a cocoa (*Theobroma cacao* L.) diallel mating design. *Euphytica*, 123: 395-399.
- Obi S.K.C. & Odibo F.J.C. (1984). Partial Purification and Characterization of a Thermo stable Actinomycete beta-Amylase. *Applied and Environmental Microbiology*, (3): 571-575.
- Ondobo M.L., Onomo P.E., Djocgoue P.F., Ndjaga J.M., Boudjeko T. & Ndoumou D.O. (2014). Phenolic content and heritability of resistance in four hybrid populations of *Theobroma cacao* L. after leaves inoculation with *Phytophthora megakarya*. Bras. & Grif. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 8(1): 17-30.
- Ongena M. & Jacques P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*, 16(3) : 115-125.
- ONU-REDD. (2016). Analyse qualitative des facteurs de déforestation et de dégradation des forêts en Côte d'Ivoire, Rapport Final 2016, BNETD/ETC TERRA/RONGEAD, Côte d'Ivoire, 114p.
- Opoku I.Y., Appiah A.A., Akrofi A.Y. & Owusu G.K. (2000). *Phytophthora megakarya* a potential threat to the cocoa industry in Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science*, 33: 237-248.

- Opoku I.Y., Akrofi A.Y., & Appiah A.A. (2007 a). Assessment of sanitation and fungicide application directed at cocoa tree trunks for the control of *Phytophthora* black pod infections in pods growing in the canopy. *European Journal of Plant Pathology*, 117: 167-175.
- Opoku, I. Y., Assuah, M. K. & Aneani F. (2007 b). Management of black pod disease of cocoa with reduced number of fungicide application and crop sanitation. *African Journal of Agricultural Research*, 2: 601-604.
- Oteino N., Lally R.D., Kiwanuka S., Lloyd A., Ryan D., Germaine K.J., Dowling D.N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6(745): 1-10.
- Ouattara A. (2015). Isolement et caractérisation phénotypique des Bactéries endophytes associées au cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Mémoire de Master en Sciences de la Vie et de la Terre, Option Microbiologie des Sols, UFR Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire, 77p.
- Ouattara A., Coulibaly K., Konate I., Kebe B.I., Beugre G.A.M., Tidou A.S. & Abdelkarim F.-M. (2020). Screening and Selection *in vitro* and *in vivo* of Cocoa Tree (*Theobroma Cacao* Linn) Endophytic Bacteria Having Antagonistic Effects against *Phytophthora* Spp. Fungal Agents Responsible of Black Pod Disease in Côte d'Ivoire. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 8(1): 25-31.
- Ozaktan H, Cakir B, Gul A, Yolageldi L, Akkopru A, Fakhraei D. & Akbaba M. (2015). Isolation and evaluation of endophytic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* infecting Cucumber plants. *Austin Journal of Plant Biology*, 1(1): 1-6.
- Padder S.A., Dar G. H., Bhat Z.A., Verma K. & Wani A.B. (2017). Morphological metabolic and biochemical characterization of bacterial root endophytes associated with brown sarson (*Brassica rapa* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2): 226-232.
- Panchal H. & Ingle S. (2011). Isolation and characterization of endophytes from the root of medicinal plant *Chlorophytum borivilianum* (Safed musli). *Journal of Advanced Development Research*, 2(2): 205-209.
- Park J. H., Bolan N., Megharaj M. & Naidu R. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185: 829-836.
- Park M., Kim C., Yang J., Lee H., Shin W., Kim S. & Sa T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160: 127-133.
- Parmar K. B., Mehta B. P. & Kunt M. D. (2016). Isolation, characterization and identification of potassium solubilizing bacteria from rhizosphere soil of maize (*Zea mays*). *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(5): 3030-3037.
- Parmar P. & Sindhu S.S. (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiological Researches*, 3(1): 25-31.
- Parray J.A., Jan S., Kamili A.N., Qadri R.A., Egamberdieva D. & Ahmad P. (2016) Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35: 877-902.

- Paul D. & Sinha S.N. (2015). Isolation and characterization of a phosphate solubilizing heavy metal tolerant bacterium from River Ganga, West Bengal, India. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 37 (6): 651-657.
- Paul N.C., Ji S.H, Deng J.X. & Yu S H. (2013). Assemblages of endophytic bacteria in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) antifungal activity against phytopathogens *in vitro*. *Plant Omics Journal*, 6(6): 441-448.
- Paulin D., Ducamp M. & Lachenaud Ph. (2010), Evaluation des cacaoyers spontanés de Guyane française pour leur résistance à *Phytophthora megakarya*. 15^{ème} Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère, 9-14 octobre 2006, San José, Costa Rica, 41-47.
- Pedrosa F.O., Monteiro R.A & Wassem R. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet*, 7(5), e1002064: 1-10.
- Pei C., Mi C., Sun L., Liu W., Li O. & Hu X. (2017) Diversity of endophytic bacteria of *Dendrobium officinale* based on culture-dependent and culture-independent methods, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(1): 112-119.
- Pettigrew, W. T. (2008). Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. *Physiology of Plant*, 133: 670-681.
- Philippot L, Hallin S & Scholetr M. (2007). Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96: 135-190.
- Phillips-Mora W., Aime M.C., Wilkinson M.J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56: 911-922.
- Phillips-Mora W., Castillo J., Arciniegas A., Mata A., Sánchez A., Leandro M., Astorga C., Motamayor J., Guyton B., Seguíne E. & Schnell R. (2010). Overcoming the main limiting factors of cacao production in Central America through the use of improved clones developed at CATIE. Proceedings of the 16th International Cocoa Research Conference, COPAL, Bali, Indonésie, 16-21 Nov. 2009. COPALCPA, Lagos, Nigeria, 93-99.
- Pierzynski G. M., McDowel R. W. & Sims J. T. (2005). Chemistry, cycling and potential Movement of Inorganic Phosphorus in Soils. *In: Phosphorus: Agriculture and the Environment*, ASA, CSSA & SSSA, San Antonio, TX: 53-86.
- Pikovskaya R. I. (1948). Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with Vital Activity of Some Microbial Species. *Microbiology*, 17: 362-370.
- Ploetz R. (2016). The Impact of Diseases on Cacao Production: A Global Overview *In: Cacao Diseases*, Bailey B.A., Meinhardt L.W. (Editors), *Springer International Publishing* Switzerland, Beltsville, USA: 33-59.
- Pohé J. (2012). *Phytophthora* spp. Agents des maladies de diverses plantes. *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologies*, 19: 72-87.
- Pohé J., Pohe S.S.W. & Okou Staëlle F.F. (2013). Association oxyde de cuivre et metalaxyl dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 16(3): 2362-2368.

- Pokou N., N’Goran J., Eskes A. & Sangare A. (2009). Cocoa farm survey in Côte d’Ivoire. In *International Workshop on Cocoa Breeding for Farmers’ Needs*, 26 p.
- Popp J., Petö K. & Nagy J. (2013). Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomic and Sustainable Development*, 33: 243-255.
- Pozo M.J. & Azcón-Aguilar C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 393-398.
- Prajapati K. B. & Modi H. A. (2012). Isolation and Characterization of Potassium Solubilizing Bacteria from Ceramic Industry Soil. *CIBTech Journal of Microbiology*, 1(2-3): 8-14.
- Prasad M.P. & Dagar S. (2014). Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. *International Journal of Current Microbiology and applied Science*, 3: 937- 947.
- Priest D.L., Karageoghus C.J. & Sharp N.C.C. (2004). The characteristics and effects of motivational music settings: The possible influence of gender, age, frequency of attendance, and time of attendance. *Journal of sports medecine and physical fitness*, 44(1): 77-86.
- Provorov N.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I. A. (2002). Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *Journal of Theoretical Biology*, 214: 215-232.
- Purnomo E., Mukarlina & Rahmawati. (2017). Uji antagonis bakteri *Streptomyces* spp. terhadap jamur *Phytophthora palmivora* BBK01 penyebab busuk buah pada tanaman kakao. *Protobiont*, 6: 1-7.
- R Core Team (2018). A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria: 2673p.
- Raaijmakers J.M., Vlami M. & De Souza J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 537-547.
- Rai A. (2017). Effet du stress salin sur les bactéries du sol : rôle d’extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie- plante sous stress salin. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie, 246p.
- Rai A. & Nabti E. 2017. Plant Growth-Promoting Bacteria: Importance in Vegetable Production. (Chapter 2) *In: Microbial Strategies for Vegetable Production*. Zaidi A. & Khan M.S. (Editors), India, *Springer International Publishing* AG: 23-48.
- Rajagopalan G. & Krishnan C. (2008). Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 99: 3044-3050.
- Rajawat M. V. S., Ansari W. A., Singh D. & Singh R. (2019). Potassium Solubilizing Bacteria (KSB) (Chapter 9) *In: Microbial Interventions in Agriculture and Environment*: Singh D. P. & Prabha R. (Editors). India, *Springer, Singapore*: 189-208.
- Ranjard L., Maron P.A. & Cuny P. (2017). La microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental. *Edition ADEME*, 235p.

- Reddy P.P. (2014). Potential Role of PGPR in Agriculture. *In: Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection*. Reddy, P. P. (Editor.) *Springer*, India: 17-34.
- Rehan M., Swanson E. & Tisa L.S. (2016). *Frankia* as a Biodegrading Agent. (Chapter: 11) *In: Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. Dharumadurai D. & Yi Jiang (Editors). *Publisher Tech Open Access*: 270-290.
- Rehman S., Harris P.J.C. & Ashraf M. (2005). Stress environments and their impact on crop production. *In: Abiotic Stresses: Plant Resistance through Breeding and Molecular Approaches*. Ashraf M. & Harris P.J.C. (editors), *Haworth Press, New York*: 3-18.
- Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., Van Montagu M. & Hurek T. (2006). An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 181-188.
- Reiter B., Bürgmann H., Burg K. & Sessitsch A. (2003). Endophytic *nif* H gene diversity in African sweet potato. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 549-555.
- Rendueles O. & Ghigo J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5): 972-989.
- Renella G., Egamberdiyeva D., Landi L., Mench M. & Nannipieri P. (2006). Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 702-708.
- Reva O.N., Smirnov V.V., Pettersson B. & Priest F.G. (2002). *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 101-107.
- Reyes I., Baziramakenga R., Bernier L. & Antoun H. (2001). Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild type strain and two UV induced mutants of *Penicillium regulosum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1741-1747.
- Rfaki A., Nassiri L. & Ibjibijen J. (2014). Genetic Diversity and Phosphate Solubilizing Ability of *Triticum aestivum* Rhizobacteria Isolated from Meknes Region, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 8: 1931-1938.
- Riethmüller A., Voglmayr H., Göker M., Weiß M. & Oberwinkler F. (2002). Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94(5): 834-849.
- Rochelle D.H., Stephen I. N.E., Daniel E.D., Huey-Min H. & Lynette E. (2005). *Bacillus subtilis* is a Potential Degradator of Pyrene and Benzo[a]pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(2): 267-271.
- Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T. & Bashan Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, 287: 15-21.
- Roger P.A. & Garcia J-L. (2001). Introduction à la microbiologie du sol. Pycopié du cours Université de Provence, Université de la Méditerranée, Ecole Supérieure d'Ingénieurs, de Lunn, 191p.
- Rajo F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5): 658-684.

- Rosenblueth M. & Martínez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 19: 827-837.
- Ruf F., Kla A.G., Dja K. & Kiendré J. (2014). La fiente de poulet dans les cacaoyères de Côte d'Ivoire une révolution agroécologique et sociale. Une innovation villageoise frugale, Rapport de mission 15 p.
- Ruzaidi A., Abbe M.A., Nawalyah I., Muhajir A.G., Pauliena H. & Muskinah M.S. (2008). Hypoglycaemic properties of Malaysian cocoa (*Theobroma cacao*) polyphenols-rich extract, *International Food Research Journal*, 15(3): 305-312.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Paré P.W. & Kloepper J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 4927-4932.
- Saber K., Nahla L.D. & Chedly A. (2005). Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agronomy for Sustainable Development*, 25: 389-393.
- Saharan B.S. & Nehra V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21: 1-30.
- Sahgal M. & Johri B.N. (2003). The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*, 84: 43-48.
- Sahu S., Gunasekaran K., Raju H.K., Vanamail P., Pradhan M.M. & Jambulingam P. (2014). Response of malaria vectors to conventional insecticides in the southern districts of Odisha State, India. *Indian Journal of Medical Research*, 139 (2): 294-300.
- Sandhya V., Ali S.K.Z., Grover M., Reddy G. & Venkateswarlu B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils*, 46: 17-26.
- Sangeeth K., Bhai R. S. & Srinivasan V. (2012). *Paenibacillus glucanolyticus*, a promising potassium solubilizing bacterium isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.) rhizosphere. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 21(2): 118-124.
- Santos I.V., Bulle C., Lévassieur A. & Deschênes L. (2018). Regionalized Terrestrial Ecotoxicity Assessment of Copper-Based Fungicides Applied in Viticulture. *Sustainability*, 10(2522):1-16.
- Santoyo G., Hagelsieb M.G., Carmen M., Bernard R.M.O. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183: 92-99.
- Saravanan V., Madhaiyan M. & Thangaraju M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66: 1794-1798.
- SAS. (1995). Guide to the use of PC-SAS Version 6.04 for DOS for Statistical Analysis. SAS Institute, Cary, North Carolina. SAS Publishing, 5136p
- Schalk I.J., Hannauer M. & Braud A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, 13: 2844-2854.
- Schmid F., Moser G., Müller H. & Berg G. (2011). Functional and Structural Microbial Diversity in Organic and Conventional Viticulture: Organic Farming Benefits Natural Biocontrol Agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2188-2191.

- Scholey A. & Owen L. (2013). Effects of chocolate on cognitive function and mood: a systematic review. *NutritionReviews*, 71(10): 665-681.
- Schroth G. & Harvey C.A. (2007). Biodiversity conservation in cocoa production landscapes: an overview. *Biodiversity Conservation*, 16(8): 2237-2244.
- Seghers D., Wittebolle L., Top E.M., Verstraete W. & Siciliano S.D. (2004). Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. Endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1475-1482.
- Sen A., Daubin V., Abrouk D. & Gifford I. (2014). Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes. The orders 'Frankiales' and Micrococcales should be split into coherent entities: proposal of Frankiales ord. nov., Geodermatophilales ord. nov., Acidothermales ord. nov. and Nakamurellales ord. nov. Alison M. Berry and Philippe Normand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 3821-3832.
- Senthil-Nathan S. (2015). A Review of Biopesticides and Their Mode of Action against Insect Pests. In: Environmental Sustainability (Book). Thangavel P. & Sridevi G. (Editors), *Springer India*: 49-63.
- Setyowati P.L., Wibowo A. & Arwiyanto T. (2019). Penapisan Bakteri Antagonis Dari Buah Kakao Untuk Menekan Perkembangan Penyakit Busuk Buah Kakao. In: Prosiding Seminar Nasional IX Perhimpunan Fitopatologi Indonesia 2018. Joko T., Wibowo A. & Suryanti (Editors.). PFI Komda Joglosemar, Yogyakarta, ISBN: 9-772548-4351B3: 31-42.
- Sgroy V., Cassan F., Masciarelli O., Papa M.F., Lagares A. & Luna V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(2): 371-381.
- Sharma S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. & Gobi, T.A. (2013) Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. *SpringerPlus*, 2: 587-601.
- Sheng X.F. (2005). Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1918-1922.
- Shishkoff N. & McGrath M. T. (2002). AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. *Plant Disease*, 86: 915-918.
- Silver S. & Phung L.T. (2005). Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2): 599-608.
- Simo C., Djougoue P.F., Mbouobda H.D., Effa O.P., Boudjeko T., Ndiang Z. & Omokolo N.D. (2014). Assessing relationship between phenolic compounds and resistance to Phytophthora megakarya using two cocoa (*Theobroma cacao* L.) families. *African Journal of Biotechnology*, 13(9): 2956-2965.
- Singh N., Ma L. Q., Vu J. C. & Raj A. (2009). Effects of arsenic on nitrate metabolism in arsenic hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ferns. *Environmental Pollution*, 157: 2300-2305.

- Singh R.P. & Jha P.N. (2015). Plant growth promoting potential of ACC deaminase Rhizospheric bacteria isolated from *Aerva javania*: A plant adapted to saline environments. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 4: 142-152.
- Sinha S. N. & Paul D. (2014). Heavy metal tolerance and accumulation by bacterial strains isolated from waste water. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4: 812-817.
- Sinha S.N., Biswas M., Paul D. & Rahaman S. (2011). Biodegradation potential of bacterial isolates from tannery effluent with special reference to hexavalent chromium. *Biotechnology Bioinformatics and Bioengineering*, 1(3): 381-386.
- Snyder L.A.S., Loman N., Pallen M.J. & Penn C.W. (2009). Next-generation sequencing-the promise and perils of charting the great microbial unknown. *Microbial Ecology*, 57: 1-3.
- Sodhi N.S. (2005). Southeast Asian biodiversity: An impending disaster. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(12): 654-660.
- Sofos J.N., Raharjo S., Dexter D.R. & Worfel R.C. (1995). Quality characteristics of restructured beef steaks manufactured by various techniques. *While only library*, 10: 1365-2621.
- Soler A., Alphonsine P.-M., Corbion C., Marie-Luce S. & Quénéhervé P. (2012). Les défenses naturelles des plantes contre les bioagresseurs : un nouvel atout dans la mise au point de systèmes de cultures plus écologiques. *Pôle de recherche agro-environnementale de la Martinique (PRAM)*, 4p.
- Somarriba E. & Beer J. (2011). Productivity of *Theobroma cacao* agroforestry systems with timber or legume service shade trees. *Agroforestry Systems*, 81(2): 109-121.
- Somasegaran P. (1994). Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. *New York: Springer-Verlag*: 167: 1-6.
- Somers E., Vanderleyden J. & Srinivasan M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(4): 205-240.
- Son H. J., Park G.T., Cha M.S. & Heo M.S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97: 204-210.
- Sonwa D.J., Coulibaly O., Weise S.F., Adesina A.A. & Janssens M.J.J. (2008). Management of cocoa constraints during acquisition and application of pesticides in the humid forest zones of southern Cameroon. *Crop Protection*, 27: 1159-1164.
- Sørensen J. & Sessitsch A. (2006). Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. *In: Modern Soil Microbiology* (2nd edn), van Elsas J.D., Jack T.T., Janet K.J. & Paola N. (Editors). CRC Press: 211-36.
- Souza S.A., Xavier A.A., Costa M.R., Cardoso A.M.S., Pereira M.C.T. & Nietzsche S. (2013). Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2): 252-264.
- Spiegelman D., Whissell G. & Greer C. W. (2005). A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 355-386.

- Srividya S., Soumya S. & Pooja K. (2009). Influence of environmental factors and salinity on phosphate solubilization by a newly isolated *Aspergillus niger* F7 from agricultural soil. *African Journal of Biotechnology*, 8 (9): 1864-1870.
- Steenhoudt O. & Vanderleyden J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4): 487-506.
- Studholme D.J., Glover R.H. & Boonham N. (2011). Application of high-throughput DNA sequencing in phytopathology. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 87-105.
- Štyriaková I., Štyriak I., Galko D., Hradil P., Bezdička P. (2003). The release of iron-bearing minerals and dissolution of feldspars by heterotrophic bacteria of *Bacillus* species. *Ceram. Silik.* 47: 20-26.
- Sumiyoshi E., Matsuzaki K., Sugimoto N., Tanabe Y., Hara T., Katakura M., Miyamoto M., Mishima S. & Shidal O. (2019). Sub-Chronic Consumption of Dark Chocolate Enhances Cognitive Function and Releases Nerve Growth Factors: A Parallel-Group Randomized Trial. *Nutrients*, 11(2800): 1-15.
- Sun L.-N., Zhang Y.-F., He L.-Y., Chen Z.-J., Wang Q.-Y., Qian M. & Sheng X.-F. (2010). Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 101: 501-509.
- Surujdeo-Maharaj S., Sreenivasan T.N., Motilal L.A. & Umaharan P. (2016). Black Pod and Other *Phytophthora* Induced Diseases of Cacao: History. In: Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters. Bryan A. Bailey, Lyndel W. Meinhardt (Editors), *Springer, Beltsville, MD USA*: 213-266.
- Tahi M., Kébé B.I., Eskes A.B., Outtara S., Sangare A. & Mondeil F. (2000). Rapid screening of cacao genotypes for field resistance to *Phytophthora palmivora* using leaves, twigs, and root. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 87-94.
- Tahi G.M., Kebe B.I., N’Goran J.A.K., Sangare A., Mondeil F. & Cilas C. (2006 a). Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot, *Phytophthora palmivora* comparing leaf disc inoculations with field observations. *Euphytica*, 149: 35-44.
- Tahi G.M., Kebe B.I., Sangare A., Mondeil F., Cilas C. & Eskes A. B. (2006 b). Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: interaction of cacao genotype, leaf age and duration of incubation. *Plant Pathology*, 55: 776-782.
- Tahi M., Kébé B. I., Sangare A., Cilas C. & Eskes A.B. (2007). Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: the effect of light intensity and time of day on leaf collection. *Plant Pathology* 56: 219-226.
- Tahi G. M., Lachenaud Ph., N’Goran J.A.K. & Eskes A. B. (2012). Comportement et utilité des géniteurs Guyanais dans le programme d’amélioration génétique du cacaoyer en Côte d’Ivoire, 17ème conférence internationale sur la recherche cacaoyère, du 15 au 20 octobre 2012, Yaoundé, Cameroun, 11p.
- Tahi G.M., Trebissou I.C., Guiraud S.B., Ribeyre F., Lachenaud Ph., Pokou N. D., N’guessan K. F., Walet P. N., Aka R. A., Coulibaly K., Kébé B. I., Assi M. E., Koné B., Kassin E. & Cilas C.

- (2017). Second recurrent cocoa selection cycle in Côte d'Ivoire: genetic parameters in the two constitutive populations after thirteen years of observations. *International Symposium on Cocoa Research (ISCR)*, Lima, Peru, 13-17 November 2017, 1-12.
- Tarjot M. (1972). Étude anatomique de la cabosse de cacao en relation avec l'attaque du *Phytophthora palmivora*. *Café Cacao Thé*, vol. XVI, n° 2, avril-juin 1972, 10p.
- Tchan Y.T. (1984). Family II Azotobacteraceae Pribram 1933, 5AL. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 1, Krieg N.R., Holt J.G. (Editors). *Williams & Wilkins, Baltimore*: 219-220.
- Técher D., Laval-Gilly P., Henry S., Bennisroune A., Formanek P., Martinez-Chois C., D'Innocenzo M., Muanda F., Dicko A., Rejsek K. & Falla J. (2011). Contribution of *Miscanthus x giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: An in vitro study. *Science of the Total Environment*, 409: 4489-4495.
- ten Hoopen G.M., Sounigo O., Babin R., Yede Dikwe G. & Cilas C. (2011). Spatial and temporal analysis of a *Phytophthora megakarya* epidemic in a plantation in the centre region of Cameroon. *Proceedings of the 16th International Cocoa Research Conference*, 16-21st November, 2009, Bali, Indonesia: 683-687.
- ten Hoopen G.M. & Krauss U. (2016). Biological Control of Cacao Diseases In: Bryan A. Bailey & Lyndel W. Meinhardt (eds) *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters. Springer International Publishing, Switzerland* : 511-566.
- Terrat S., Karimi B., Dequiedt S., Chemidlin N., Horrigue W., Djemiel C. & Ranjard L. (2018). La caractérisation des communautés microbiennes du sol à l'échelle de la France pour évaluer l'effet de l'usage des sols. *Innovations Agronomiques*, 69: 27-37.
- Thakore Y. (2006). The biopesticide market for global agriculture use. *Industrial Biotechnology*, 2: 194-208.
- Thevenin J.-M., Rossi V., Ducamp M., Doare F., Condina V. & Lachenaud P. (2012). Numerous Clones Resistant to *Phytophthora palmivora* in the "Guiana" Genetic Group of *Theobroma cacao* L. *PLoS ONE*, 7(7): 1-6.
- Thines M. (2014). Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes: a global overview. *European Journal of Plant Pathology*, 138(3): 431-447.
- Thomas L., Gupta A., Gopal M., ChandraMohan R., George P. & Thomas G.V. (2011). Evaluation of rhizospheric and endophytic *Bacillus* spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from *Theobroma cacao* L. for antagonistic reaction to *Phytophthora palmivora*, the causal organism of black pod disease of cocoa. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 39: 370-376.
- Thomazella D.P., Teixeira P.J., Oliveira H.C., Saviani E.E., Rincones J., Toni I. M., Reis O., Garcia O., Meinhardt L. W., Salgado I., & Pereira G.A. (2012). The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist*, 194: 1025-1034.
- Tijjani A., Bashir K.A., Mohammed I., Muhammad A., Gambo A. & Musa H. (2016). Biopesticides for Pests Control: A Review. *Journal of Biopesticides and Agriculture*, 3 (1): 1-13.

- Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., de R., Saxena A.K., Nautiyal C.S., Mittal S., Tripathi A.K. & Johri B.N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89: 136-150.
- Tin M.L., Hlaing S.W., Ei P.K., Zaw K.L. & San S.Y. (2013). Characterization of Phosphate Solubilizing and Potassium Decomposing Strains and Study on their Effects on Tomato Cultivation. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(2): 176-180.
- Tiwari S., Lata C., Chauhan P.S. & Nautiyal C.S. (2016). *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99: 108-117.
- Tiwari S., Prasad V., Chauhan P.S. & Lata C. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* Confers Tolerance to Various Abiotic Stresses and Modulates Plant Response to Phytohormones through Osmoprotection and Gene Expression Regulation in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 8(1510): 1-15.
- Tondje P.R., Roberts D.P., Bon M.C., Widmer T., Samuels G.J., Ismaiel A., Begoude A.D., Tchana T., Nyemb-Tshomb E., Ndoumbe-Nkeng M., Bateman R., Fontem D. & Hebbar K.P. (2007). Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological Control*, 43: 202-212.
- Tran H. T., Ficke A., Asiiimwe T., Hofte M. & Raaijmakers J. M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175: 731-742.
- Van der Auwera R., De Baere Y., Van de Peer P., De Rijk., Van de Broeck R. & De Wachter. (1995). The phylogeny of the Hypochytriomycota as deduced from ribosomal RNA sequences of *Hypochytrium catenoides*. *Molecular Biology and Evolution*, 12 (4): 671-678.
- van Vliet J.A. & Giller K.E. (2017). Mineral Nutrition of Cocoa: A Review. 70p.
- Vandenbergh L. P. de S., B. Garcia L. M., Rodrigues C., Camara M. C., Pereira G. V. de M., de Oliveira J. & Soccol C. R. (2017). Potential applications of plant probiotic microorganisms in agriculture and forestry, *AIMS Microbiology*, 3(3): 629-648.
- Vega F. E., Pava-Ripoll M., Posada F. & Buyer J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology*, 45(5): 371-380.
- Verma V.C., Gond S.K., Kumar A., Mishra A., Kharwar R.N. & Gange A.C. (2009) Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microbial Ecology*, 57: 749-756.
- Vetrivelkai P., Sivakumar M. & Jonathan E.I. (2010). Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi. *Journal of Biopesticides*. 3(2): 452-457.
- Volpiano C.G., Estevam A., Saatkamp K., Furlan F., Vendruscolo E.C.G. & Santos M.F.D. (2014). Physiological responses of the co-cultivation of PGPR with two wheat cultivars *in vitro* under stress conditions. *BMC Proceedings*. 8(4):p108.
- Vos C., Claerhout S.M.K., Awire R., Panis B., De Waele D. & Elsen A. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi reduce root-knot nematode penetration through altered root exudation of their host. *Plant Soil*, 354: 335-345.

- Vos J.G.M., Barbara J. R. & Flood. J. (2003). A la découverte du cacao. Un guide stimulant pour la formation des facilitateurs. *CABI Biosciences, a division of CAB International* : 11-58.
- Vyas P. & Gulati A. (2009). Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, 9(174): 1-15.
- Wang C-J., Yang W., Wang C., Gu C., Niu D-D., Liu H-X., Wang, Y.P. & Guo; J.-H. (2012) Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth Promoting Rhizobacterium Strains. *PLoS ONE*, 7(12): 1-10.
- Waterhouse G. M., Newhook F.J. & Stamps D.J. (1983). Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: Erwin D.C., Bartnicki-Garcia S. & Tsao P.H., (editors). *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. St Paul, Minnesota. *American Phytopathological Society*: 139-147.
- Widmer T. L. & Laurent, N. (2006). Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* pathogenic to *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 377-388.
- William J. H. & Daniel K. M. (2009). Reduction of Selenite to Elemental Red Selenium by *Pseudomonas* sp. Strain CA5. *Current Microbiology*, 58: 493-498.
- Wolde-meskel E., Terefework Z., Frostegard A. & Lindström K. (2005). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1439-1452.
- Wu Y., Stulp R. P., Elfferich P., Osinga J., Buys C. H. & Hofstra R. M. (1999). Improved mutation detection in GC-rich DNA fragments by combined DGGE and CDGE. *Nucleic Acids Research*, 27 (15): 1-3.
- Xia X., Lie T. K. & Qian X. (2011). Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. *Microbial Ecology*, 61: 619-625.
- Yadav K. & Singh T. (1991). Phosphorus Solubilization by Microbial Isolate from Caci fluent. *Journal of Indian Society for Sciences*, 39: 89-93.
- Yahaghi Z., Mehran S., Farshid N., Teodoro C. de la P., José J.P. & Majid T. (2018). Isolation and Characterization of Pb-Solubilizing Bacteria and Their Effects on Pb Uptake by *Brassica juncea*: Implications for Microbe Assisted Phytoremediation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7): 1156-1167.
- Yamada Y. & Yukphan P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1): 15-24.
- Yapo K. D. Ouffoue S. K., N'guessan B. R., Okpekon T. A., Dade J., Say M. & Kouako T. H. (2014). Quality control by the determination of heavy metals in new variety of cocoa (cocoa mercedes) Côte d'Ivoire. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 37: 56-64.
- Yang J. Y., Scascitelli M., Motilal L. A., Sveinsson S., Engels J. M. M., Kane N. C., Dempewolf H., Zhang D., Maharaj K. & Cronk Q. C. B. (2013). Complex origin of *Trinitario*-type *Theobroma cacao* (Malvaceae) from Trinidad and Tobago revealed using plastid genomics. *Tree Genetics & Genomes*, 9: 82-840.

- Yang J., Kloepper J. W. & Ryu C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14: 1-4.
- Yanke L. J., Bryant R. D. & Laishley E. J. (1995). Hydrogenase (I) of *Clostridium pasteurianum* functions a novel selenite reductase. *Anaerobe*, 1: 61-67.
- Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M. J, Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M. & Yassin A.F. (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 959-963.
- Young C.C., Lin S.Y., Shen F.T. & Lai W.A. (2015). Molecular tools for identification and characterization of plant growth promoting rhizobacteria with emphasis in *Azospirillum* spp. In: Cassán FD, Okon Y and Creus CM (Eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols. Springer International Publishing, Switzerland: 27-44.*
- Yuan Z-S., Liu F. & Zhang G-F. (2015). Isolation of Culturable Endophytic Bacteria from Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) And 16s RDNA Diversity Analysis. *Archives of Biological Science Belgrade*, 67(3): 1001-1008.
- Zaitlin B., Watson S., Dixon J. & Steel D. (2003). Actinomyetes in Elbow River Basin Alberta Canada. *Water Quality Ressource Journal Canada*, 38(1): 115-125.
- Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M. & Steward G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 5: 539-554.
- Zentmyer G.A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and the diseases its causes. In: Book Monograph, *American Phytopathological Society*.10: 96p.
- Zhang C. & Kong F. (2014). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*, 82: 18-25.
- Zhang D., Martinez W. J., Johnson E. S., Somarriba E., Phillips-Mora W., Astorga C., Mischke S. & Meinhardt L. W. (2011 a). Genetic diversity and spatial structure in a new distinct *Theobroma cacao* L. population in Bolivia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 239-252.
- Zhang Y.F., He L. Y., Chen Z.J., Zhang W.H., Wang Q.Y., Qian M. & Sheng X.F. (2011 b). Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. *Journal of Hazardous Mater*, 186: 1720-1725.
- Zhang X. X., Gao J. S. & Cao Y. H. (2013). Long-term rice and green manure rotation alters the endophytic bacterial communities of the rice root. *Microbial Ecology*, 66: 917-926.
- Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L. & Hu P. (2013). *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(7): 2618-2624.
- Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z., Kuczmariski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Barletta R.G. & Vidaver A.K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2198-2208.

- Zubir I., Ross E.E.R., Hamzah A. & Aqma W.S. (2019). Endophytic bacteria with antagonistic activities against pathogenic fungal *Oncobacidium theobromae* of cocoa. *Bioscience Research*, 16(1): 648-657.
- Zuidema P.A., Leffelaar P.A., Gerritsma W., Mommer L. & Anten N.P.R. (2005). A physiological production model for cocoa (*Theobroma cacao*): model presentation, validation and application. *Agricultural Systems*, 84: 195-225.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture pour la caractérisation phénotypique des bactéries endophytes (g / L)

1. Milieu YEM

Le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) est un milieu d'extrait de levure et de mannitol dont la composition est la suivante :

Mannitol.....	5 g
Extrait de levure.....	1 g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O.....	0,46 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Eau distillée.....	1 Litre

Le pH du milieu est ajusté à 7,2. Dans le cas de la gélose YEM solide (YEMA), le rouge Congo est additionné à une concentration finale de 0,0025 % et 15 g d'agar sont ajoutés par litre de milieu.

La stérilisation est faite à 121 °C pendant 20 min

2. Milieux d'identification des Actinomycètes

ISP1

Tryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Agar	20 g
pH: 7,0-7,1	

ISP2

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
pH: 7,3	

ISP4

Amidon soluble	10 g
NaCl.....	1 g
CaCO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Solution saline1	1 mL
Agar	20 g
pH: 7,0-7,4	

ISP9

(NH ₂) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄	5,65 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
Solution saline2	1ml
Agar	20 g

YMA (Yeast Malt Extract Agar)

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
pH: 7,3	

Gausse modifier

Amidon.....	20 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KNO ₃	1 g
Agar	20 g
pH: 7,5	

Solution saline1

FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g / L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g / L
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 g / L

Solution d'avoine

Grains d'avoine pilés	20 g
Eau distillée	1000 mL

Solution saline2

FeSO ₄ .7H ₂ O.....	1,1 g / L
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	6,4 g / L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g / L
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	7,9 g / L

SM (Milieu synthétique)

Amidon	10 g
Extrait de levure	4 g
Peptone	2 g
Agar	20 g
pH: 7,2-7,5	

SMK (*krasilnikov's synthetic agar*)

K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄	0,03 g
Nacl	0,02 g
KNO ₃	0,1 g
FeSO ₄	0,0001 g
CaCO ₃	0,05 g
Glucose.....	2 g
Agar	15 g

3. Milieu d'identification des *Pseudomonas*

Le milieu gélose au cétrimide pour un litre de produit final est composé de :

Peptone.....	20 g
Chlorure de magnésium	1,4 g
Sulfate dipotassique	(10 g
Cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide).....	0,30 g
Glycérol	10 mL
Agar.....	13,60 g

Le pH est ajustée à 7,2 ensuite la préparation est autoclavée à 121 °C pendant 20 minutes puis est refroidie à 45-50 °C. .

4. Milieu d'identification des *Bacillus*

La gélose Mossel est composée pour un litre de produit final de :

Tryptone	10,0 g
Extrait de viande	1,0 g
D-mannitol	10,0 g
Chlorure de sodium	10,0 g
Rouge de phénol	25,0 mg
Agar agar bactériologique.....	13,5 g
Émulsion de jaune d'œuf stérile.....	25 mg

Le milieu est ajusté à pH = 7,2 et utilisé à une température de 25 °C. Ce milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes, ensuite est refroidi et est maintenu au bain marie à 44-47 °C.

Annexe 2 : Milieu PVK Solide

Glucose.....	10 g / L
Extrait de levure.....	0,5 g / L
Phosphate tricalcique.....	5 g / L
Sulfate d'ammonium.....	0,5 g / L
Chlorure de sodium.....	(0,2 g / L)
Sulfate de magnésium.....	0,1 g / L
Chlorure de potassium.....	0,2 g / L
Sulfate de manganèse.....	0,002 g / L
Sulfate de fer.....	0,002 g / L

Agar..... 1,5 g / L

Le pH est ajusté à 07

Annexe 3 : Composition du milieu Aleksandrov modifié

Glucose..... 10 g / L

Phosphate tricalcique 5 g / L

Sulfate de magnésium..... 0,1 g / L

Carbonate de calcium..... 1 g / L

Chlorure de fer..... 0,006 g / L

Poudre naturelle de mica..... 5 g / L

Agar..... 15 g / L

Le pH est ajusté est 7,0

Annexe 4 : Préparation et composition des milieux de culture utilisés pour *Phytophthora* spp.

1. Milieu petits pois gélosé (pp)

Petits pois Daucy..... 200 g

Rinçage à l'eau distillée

Broyage dans un mixeur dans 500 ml d'eau distillée

Compléter avec de l'eau distillée à 1000 mL

Ebullition pendant 5 min

Cuisson au feu doux pendant 45 min

Filtration sur toile de coton hydrophile deux fois

Filtration sur filtre à café deux fois

Compléter avec de l'eau distillée à

Agar-agar.....15 g

Autoclavage à 121 °C pendant 20 min

2. Milieu carotte agar (CA)

Rondelles de carotte200 g

Eau distillée.....1Litre

Porter à ébullition pendant 30 min

Filtrer sur toile de coton

Essorer les rondelles de carotte

Ajouter l'agar-agar.....15 g

Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée

Autoclavage à 121 °C pendant 20 min

Annexe 5: Caractérisation microscopiques des bactéries endophytes isolées de cacaoyer (*Theobroma cacao* L)

Isolats bactériens			Provenances				Caractères morphologiques microscopiques				
N°	Code I	Code II	Régions	Localités	Variété	Organes	Gram	Forme	Regpt	Spore	Position
1	BEC1	1P	Nawa	Soubré	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé		
2	BEC2	2P	Nawa	Soubré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit			
3	BEC3	3P	Nawa	Soubré	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	amas		
4	BEC4	4P	Nawa	Soubré	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
5	BEC5	5P	Nawa	Soubré	P7	Tige	Gram+	Bacille droit	isolé	Non	
6	BEC6	6P	Nawa	Soubré	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	isolé	Non	
7	BEC7	7P	Lôh-dji	Divo	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Non	
8	BEC8	8P	Lôh-dji	Divo	P7	Tige	Gram+	Bacille droit	diplo	Oui	déformante
9	BEC9	9P	Lôh-dji	Divo	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Non	
10	BEC10	11P	Lôh-dji	Divo	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
11	BEC11	12P	Lôh-dji	Divo	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	chaînette	Non	
12	BEC12	13P	Lôh-dji	Divo	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	Oui	centrale
13	BEC13	14P	Lôh-dji	Divo	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Non	
14	BEC14	16P	Lôh-dji	Divo	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	Amas	Oui	centrale
15	BEC15	17P	Lôh-dji	Divo	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	Amas	Oui	terminale
16	BEC16	18P	Bas-San	Aboisso	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	Amas	Oui	centrale
17	BEC17	19P	Bas-San	Aboisso	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	diplo	Non	
18	BEC18	20P	Bas-San	Aboisso	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	Oui	
19	BEC19	21P	Bas-San	Aboisso	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Non	
20	BEC20	22P	Bas-San	Aboisso	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
21	BEC21	23P	Bas-San	Aboisso	P7	Tige	Gram+	Bacille droit	isolé	Non	
22	BEC22	24P	Bas-San	Aboisso	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	amas	Non	
23	BEC23	25P	Bas-San	Aboisso	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	centrale
24	BEC24	26P	Bas-San	Aboisso	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	Amas	Oui	centrale
25	BEC25	27P	Guémon	Duékoué	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	chaînette	Non	
26	BEC26	28P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	Amas	Non	
27	BEC27	29P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	chaînette	Non	
28	BEC28	30P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	
29	BEC29	31P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé	Non	
30	BEC30	32P	Guémon	Duékoué	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	isolé	Non	
31	BEC31	33P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Non	
32	BEC32	34P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	

33	BEC33	35P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	terminale
34	BEC34	37P	Guémon	Duékoué	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	diplo	Oui	
35	BEC35	38P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	amas	Oui	
36	BEC36	39P	Guémon	Duékoué	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	amas	Oui	
37	BEC37	40P	Guémon	Duékoué	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	diplo	Non	
38	BEC38	41P	Guémon	Duékoué	P7	Tige	Gram+	Bacille droit	isolé	Non	
39	BEC39	42P	Nawa	Soubéré	P7	Feuille	Gram-	Bacille droit	amas	Oui	
40	BEC40	43P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
41	BEC41	44P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé	Oui	
42	BEC42	45P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
43	BEC43	46P	Nawa	Soubéré	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	amas	Non	
44	BEC44	47P	Nawa	Soubéré	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	amas	Oui	
45	BEC45	48P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
46	BEC46	49P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit			
47	BEC47	50P	Nawa	Soubéré	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	
48	BEC48	52P	Nawa	Soubéré	P7	Tige	Gram+	Bacille droit			
49	BEC49	53P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
50	BEC50	54P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	
51	BEC51	55P	Nawa	Soubéré	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
52	BEC52	56P	Nawa	Soubéré	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	
53	BEC53	57P	Guémon	Duékoué	P7	Tige	Gram+	Bacille droit	amas	Non	
54	BEC54	58P	Indenié-	Abengouro	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	isolé	oui	
55	BEC55	59P	Indenié-	Abengouro	P7	Racine	Gram+	Cocobacille	diplo	oui	
56	BEC56	60P	Indenié-	Abengouro	P7	Racine	Gram+	Bacille court	amas	Oui	
57	BEC57	61P	Indenié-	Abengouro	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	
58	BEC58	63P	Indenié-	Abengouro	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	amas	Oui	
59	BEC59	64P	Indenié-	Abengouro	P7	Racine	Gram-	Bacille droit	chaînette	Oui	
60	BEC60	65P	Indenié-	Abengouro	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
61	BEC61	66P	Indenié-	Abengouro	P7	Tige	Gram-	Bacille droit	chaînette	Oui	
62	BEC62	67P	Ht-sandra	Daloa	P7	Feuille	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
63	BEC63	68P	Ht-sandra	Daloa	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	Oui	
64	BEC64	69P	Ht-sandra	Daloa	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	
65	BEC65	71P	Ht-sandra	Daloa	P7	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	
66	BEC66	1N	Nawa	Soubéré	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé	Non	
67	BEC67	2N	Nawa	Soubéré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	oui	centrale
68	BEC68	3N	Nawa	Soubéré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	oui	Terminale

69	BEC69	4N	Nawa	Soubré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	oui	centrale
70	BEC70	5N	Nawa	Soubré	NA32	Racine	Gram+	Cocobacille	isolé	oui	centrale
71	BEC71	6N	Nawa	Soubré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	oui	centrale
72	BEC72	7N	Nawa	Soubré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	oui	centrale
73	BEC73	8N	Nawa	Soubré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	oui	centrale
74	BEC74	9N	Nawa	Soubré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	oui	centrale
75	BEC75	10N	Nawa	Soubré	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	oui	centrale
76	BEC76	11N	Indenié	Abengouro	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé	Non	
77	BEC77	12N	Indenié	Abengouro	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	oui	centrale
78	BEC78	13N	Indenié	Abengouro	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	chaînette	Non	
79	BEC79	14N	Indenié	Abengouro	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	oui	centrale
80	BEC80	15N	Indenié	Abengouro	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Non	
81	BEC81	16N	Indenié	Abengouro	NA32	Tige	Gram+	Bacille droit	isolé	oui	centrale
82	BEC82	17N	Indenié	Abengouro	NA32	Tige	Gram-	Bacille droit	chaînette	Non	
83	BEC83	18N	Indenié	Abengouro	NA32	Tige	Gram+	Bacille droit	diplo	oui	centrale
84	BEC84	19N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	oui	centrale
85	BEC85	20N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé		
86	BEC86	21N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	centrale
87	BEC87	22N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
88	BEC88	23N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	oui	Terminale
89	BEC89	24N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	centrale
90	BEC90	25N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	centrale
91	BEC91	26N	Lôh-dji	Divo	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
92	BEC92	27N	Lôh-dji	Divo	NA32	Tige	Gram+	Bacille droit	isolé		
93	BEC93	28N	Lôh-dji	Divo	NA32	Tige	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	centrale
94	BEC94	29N	Indenié	Abengouro	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	chaînette	Oui	centrale
95	BEC95	30N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	Oui	centrale
96	BEC96	31N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	centrale
97	BEC97	32N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé		
98	BEC98	33N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	centrale
99	BEC99	34N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
100	BEC100	35N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
101	BEC101	36N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	Oui	Terminale
102	BEC102	37N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
103	BEC103	39N	Bas-San	Aboisso	NA32	Tige	Gram-	Bacille droit	chaînette		
104	BEC104	41N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	diplo		

105	BEC105	42N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	chaînette	Oui	centrale
106	BEC106	43N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo	Oui	centrale
107	BEC107	44N	Bas-San	Aboisso	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas		
108	BEC108	45N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas		
109	BEC109	46N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	diplo		
110	BEC110	48N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	Terminale
111	BEC111	49N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	Terminale
112	BEC112	50N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé		
113	BEC113	51N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
114	BEC114	52N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas		
115	BEC115	53N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	diplo		
116	BEC116	54N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	amas	Oui	centrale
117	BEC117	55N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram+	Bacille droit	isolé	Oui	centrale
118	BEC118	56N	Guémon	Duékoué	NA32	Racine	Gram-	Bacille droit	isolé		
119	BEC119		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit		Non	
120	BEC120		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram-	Bacille droit		Non	
121	BEC121		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
122	BEC122		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Oui	
123	BEC123		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit		Oui	
124	BEC124		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
125	BEC125		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
126	BEC126		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram-	Bacille droit		Non	
127	BEC127		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram+	Bacille droit		Non	
128	BEC128		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram-	Bacille droit		Non	
129	BEC129		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit		Non	
130	BEC130		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
131	BEC131		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
132	BEC132		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
133	BEC133		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
134	BEC134		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
135	BEC135		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
136	BEC136		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
137	BEC137		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	
138	BEC138		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit		Non	
139	BEC139		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram+	Bacille droit		Oui	
140	BEC140		Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit		Non	

141	BEC141	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Oui	
142	BEC142	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui	
143	BEC143	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui	centrale
144	BEC144	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
145	BEC145	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Non	
146	BEC146	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	non	
147	BEC147	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram-	Bacille droit	Non	
148	BEC148	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram-	Bacille droit	Non	
149	BEC149	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
150	BEC150	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
151	BEC151	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui	
152	BEC152	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram-	Bacille droit	Non	
153	BEC153	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
154	BEC154	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram-	Bacille droit	Non	
155	BEC155	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
156	BEC156	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
157	BEC157	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
158	BEC158	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
159	BEC159	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
160	BEC160	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	OUI	
161	BEC161	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	OUI	
162	BEC162	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
163	BEC163	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui	
164	BEC164	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
165	BEC165	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui	
166	BEC166	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
167	BEC167	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	oui	
168	BEC168	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
169	BEC169	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui	
170	BEC170	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
171	BEC171	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
172	BEC172	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
173	BEC173	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Oui	
174	BEC174	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	
175	BEC175	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Oui	
176	BEC176	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non	

177	BEC177	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
178	BEC178	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
179	BEC179	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram-	Bacille droit	oui
180	BEC180	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
181	BEC181	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Oui
182	BEC182	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
183	BEC183	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
184	BEC184	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
185	BEC185	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
186	BEC186	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
187	BEC187	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram+	Bacille droit	Oui
188	BEC188	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram+	Bacille droit	Non
189	BEC189	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
190	BEC190	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
191	BEC191	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram+	Bacille droit	Oui
192	BEC192	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
193	BEC193	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Oui
194	BEC194	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram+	Bacille droit	oui
195	BEC195	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
196	BEC196	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Tige	Gram+	Bacille droit	Non
197	BEC197	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
198	BEC198	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram-	Bacille droit	Non
199	BEC199	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	oui
200	BEC200	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	
201	BEC201	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Non
202	BEC202	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
203	BEC203	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
204	BEC204	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Non
205	BEC205	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
206	BEC206	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
207	BEC207	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Oui
208	BEC208	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Non
209	BEC209	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
210	BEC210	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non
211	BEC211	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
212	BEC212	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Non

213	BEC213	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
214	BEC214	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
215	BEC215	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	Oui
216	BEC216	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Feuille	Gram+	Bacille droit	Oui
217	BEC217	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram+	Bacille droit	
218	BEC218	Ht-sandra	Daloa	Tt-venant	Racine	Gram ⁺	Bacille droit	Non

Bas-San (Bas-Sassandra) ; **Indenié-** (Indenié-Djuablin) ; **Lôh-dji** (Lôh-Djiboua) ; **Ht-sandra** (Haut-Sassandra) ; **Regpt** (Mode de Regroupement) ; Diplo (Diplobacilles)

Annexe 6 : Identification des isolats solubilisant le phosphate tricalcique

Souches	Forme	Mode de regroupement	Coloration de Gram	Catalase	Amylase	KNO ₃ 10%	Gélose au cétrimide	Gélose de Mossel	Genres présumptifs des bactéries
1P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i>
2P	bacille	Isolé	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
3P	bacille	Isolé	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
4P	bacille	Isolé	BG+	+	+	+	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
5P	bacille	Isolé	BG+	+	+	+	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
6P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	+	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i>
7P	bacille	Isolé	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
8P	bacille	Isolé	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
11P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	++	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i>
16P	bacille	Isolé	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
18P	bacille	Amas	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i>
20P	bacille	Isolé	BG+	+	+	+	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
21P	bacille	Amas	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
22P	bacille	Isolé	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
24P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	++	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp

25P	bacille	Isolé	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
29P	bacille	Amas	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
30P	bacille	Amas	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
31P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	+	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
32P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	+	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
33P	bacille	Amas	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
34P	bacille	Isolé	BG+	+	+	+	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
35P	bacille	Isolé	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
36P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
37P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
38P	bacille	Amas	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
39P	bacille	Isolé	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
40P	bacille	Isolé	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
41P	bacille	Amas	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
42P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	+	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
46P	bacille	Amas	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
47P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
55P	bacille	Amas	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp

56P	bacille	Isolé	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
58P	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
61P	bacille	Amas	BG+	+	+	+	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
1N	bacille	Amas	BG-	Test non réalisé	+	+	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
3N	bacille	Isolé	BG+	+	+	+	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
31N	bacille	Amas	BG+	+	+	+	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
33N	bacille	Isolé	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
35N	bacille	Amas	BG+	+	+	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
37N	bacille	Isolé	BG-	Test non réalisé	+	-	Colonie grisâtre + Jaune-vert fluor	Test non réalisé	<i>Pseudomonas</i> sp
41N	bacille	Amas	BG+	+	-	++	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp
53N	bacille	Amas	BG+	+	+	-	Test non réalisé	Colonie rose + halo blanc	<i>Bacillus</i> sp

Annexe 7 : Pourcentage d'inhibition des bactéries endophytes du cacaoyer contre *Phytophthora palmivora* de d'autres études similaires

Organes d'isolement	Plante hôte	Espèces des bactéries endophytes	P.I. (%)	Références
Cabosses saines	<i>T. cacao</i> L.	<i>Alkaligenes</i> sp. <i>Achromobacter xylooxidans</i> , <i>Bacillus</i> sp. <i>Burkholderia</i> spp. <i>Sphingobium yanoikuyae</i>	37,73-100	Masanto <i>et al.</i> , 2020
Cabosses et rameaux sains	<i>T. cacao</i> L.	ND	33,92-60,59	Khaeruni <i>et al.</i> , 2019
Cabosses saines	<i>T. cacao</i> L.	ND	12,51-74,76	Setyowati <i>et al.</i> , 2019
Cabosses, feuilles et tiges saines	<i>T. cacao</i> L.	<i>Bacillus altitudinis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Chryseobacterium proteolyticum</i>	60,91-82,4	Alsultan <i>et al.</i> , 2019
Cabosses saines	<i>T. cacao</i> L.	<i>Neisseria</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas putida</i>	0,01-69,7	Akrofi <i>et al.</i> , 2017
Cabosses et rameaux sains	<i>T. cacao</i> L.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	35,77	Hamzah <i>et al.</i> , 2017
Rhizosphère	<i>T. cacao</i> L.	<i>Streptomyces</i> spp,	27,37-68,17	Purnomo <i>et al.</i> , 2017
Rhizosphère	<i>T. cacao</i> L.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	36,7-51,7	Acebo-Guerero <i>et al.</i> , 2015
Rhizosphère	<i>T. cacao</i> L.	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas fluorescence</i>	69,5-72,5	Pratama <i>et al.</i> , 2013
Rhizosphère et racines	<i>T. cacao</i> L.	<i>Bacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	48-78	Thomas <i>et al.</i> , 2011
Cabosses	<i>T. cacao</i> L.	<i>Streptomyces</i> sp,	0-25	Macagnan <i>et al.</i> , 2020
Cabosses	<i>T. cacao</i> L.	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	66-82,1	Jaaffar, 2004

Source : Masanto *et al.*, 2020

**PUBLICATIONS ISSUES DE
LA THÈSE**

Screening and Selection *in vitro* and *in vivo* of Cocoa Tree (*Theobroma Cacao* Linn) Endophytic Bacteria Having Antagonistic Effects against *Phytophthora* Spp. Fungal Agents Responsible of Black Pod Disease in Côte d'Ivoire

OUATTARA Adama¹, COULIBALY Klotioloma², KONATE Ibrahim^{1*}, KEBE Boubacar Ismaël², BEUGRE G.A. Maxwell¹, TIDOU Abiba Sanogo¹, Abdelkarim FILALI-MALTOUF³

¹UFR Agro-forestry, Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Agrovalorization, Jean Lorougnon Guède University, B.P: 150 Daloa, Côte d'Ivoire

²National Center for Agronomic Research (CNRA), Laboratory of Phytopathology, BP: 808 Divo, Côte d'Ivoire

³Faculty of Sciences, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohammed V-Agdal, Rabat, Morocco

*Corresponding author: konatibrahim@yahoo.fr

Received February 12, 2020; Revised March 20, 2020; Accepted March 29, 2020

Abstract We are investigating in this study the screening and selection of cocoa tree (*Theobroma cacao* L.) endophytic bacteria having antagonistic effects against the fungi *Phytophthora* spp. and to assess their inhibitory potential as biological control agents against black pod disease in Côte d'Ivoire. A total of One hundred and sixteen bacteria were isolated from symptomless root, leaf and stem tissues of two cocoa clones NA32 (susceptible) and P7 (resistant) young seedlings. These isolates restricted the radial growth of the mycelium of *P. palmivora* (strain BL7.11.2) and *P. megakarya* (strain 13P30.1) with percentages inhibition of 28.58 to 70.54% and 25.3 to 64.29% respectively. Four isolates, 48P, 60P, 23P and 18N were more effective in *in vitro* test and selected for *in vivo* confrontation test on leaf discs. Treatments based on two isolates S1 (48P) and S2 (18N) applied at the concentration 10⁹ CFU/mL significantly ($p < 0.05$) reduced the black pod necrosis induced by the two *Phytophthora* strains on the leaf discs of three cocoa clones (NA32, PA150 and SCA6). In addition, simultaneous (C3PS1 and C3PS2) or separate (C3AVS1 and C3AVS2) inoculations of these two bacteria and *Phytophthora*, induced resistance to the clone NA32 and increased the intrinsic resistance of the clones PA150 and SCA6. This study showed that endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora* spp. can be an alternative solution in the biocontrol of black pod disease. *In situ* pod tests should be performed to confirm these preliminary results and propose effective bacterial inoculum.

Keywords: black pod, phytophthora spp, endophytic bacteria, cocoa tree, biocontrol

Cite This Article: OUATTARA Adama, COULIBALY Klotioloma, KONATE Ibrahim, KEBE Boubacar Ismaël, BEUGRE G.A. Maxwell, TIDOU Abiba Sanogo, and Abdelkarim FILALI-MALTOUF, "Screening and Selection *in vitro* and *in vivo* of Cocoa Tree (*Theobroma Cacao* Linn) Endophytic Bacteria Having Antagonistic Effects against *Phytophthora* Spp. Fungal Agents Responsible of Black Pod Disease in Côte d'Ivoire." *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, vol. 8, no. 1 (2020): 25-31. doi: 10.12691/jaem-8-1-4.

1. Introduction

The high incidence of black pod is a major constraint to cocoa production in West Africa, particularly in Côte d'Ivoire [1,2]. The control of this disease is therefore both a necessity and a priority [3,4]. Several integrated control approaches have been suggested to eradicate this disease. Copper and metalaxyl-based fungicides have been widely used [5]. Other agronomic methods such as harvesting diseased pods and using partially resistant and/or tolerant

varieties have been also applied [6,7]. However, none of them have given conclusive results. Biological control agents have been considered as an alternative approach to control various plant diseases [8]. The use of endophytic bacteria as biological control agents against plant diseases has attracted considerable interest in scientific research [9]. Their ability to colonize the host plant tissues has made them valuable and effective for sustainable agriculture and has provided a tool to improve crop yield compared to other biological agents [10,11]. As internal colonizers of the root system, endophytes can compete within the vascular system, inhibiting pathogens to obtain both

nutrients and space for their proliferation. Many bacteria belonging to the genera *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp and fungi such as *Trichoderma* spp and *Aspergillus* spp have effective antifungal activity to control *Phytophthora* diseases [12,13,14]. The aim of this study was to screen and to select cocoa tree (*Theobroma cacao* L.) endophytic bacteria with antagonistic effects against *Phytophthora* spp. and to assess their potential as biological control agents against black pod disease in Côte d'Ivoire.

2. Material and Methods

2.1. Material

2.1.1. Fungal Strains

Two strains BL7.11.2 and 13P30.1 of *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora megakarya* respectively isolated in the year 2000 and 2013 from naturally infected cocoa pods were used. These strains were stored in a mycobank at National Agronomic Research Center (CNRA)'s Phytopathology Laboratory in Bingerville (Côte d'Ivoire) and were periodically isolated once more from infected cocoa pods to maintain their virulence.

2.1.2. Bacterial Isolates

One hundred and sixteen (116) endophytic bacteria were isolated from young seedlings organs (roots, stems and leaves) of two clones (NA32 and P7 respectively susceptible and resistant to black pod) as described by Konaté et al. [15] and Rayda et al. [16].

2.1.3. Plant Material

Young symptomless leaves of three cocoa clones NA32, PA150 and SCA6 respectively susceptible, moderately resistant and resistant to black pod, were collected. The sampling was done from non-lignified twigs of ten trees per clone at the Divo research station (CNRA). A total of

seven hundred and twenty (720) leaves were taken, at the rate of two hundred and forty (240) leaves per clone and twenty four (24) leaves per tree. The collected leaves were stored in moistened plastic bags and transported in a cooler.

2.2. Methods

2.2.1. In vitro Antagonism Assay

In vitro pairing assays were conducted on carrot extract agar against pathogens *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya*. Bacteria were streaked in line dividing the agar plates into two equal parts [17]. Two discs of mycelium calibrated to 5 mm in diameter from a five-day-old culture of each strain of *Phytophthora* grown on pea extract agar were placed apart on each side of the bacterial streaks (01 cm from the edge of the Petri dish). Control plates consisted of the mycelial discs without bacterial streaks. Plates were then incubated in darkness at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ and were observed after twenty four hours. Three replicate plates were prepared for all bacteria and for each pathogen strain.

2.2.2. Calculation of Percentage Inhibition (P.I.)

Growth of *Phytophthora* strains was recorded by measuring the diameter of the colonies each day using a ruler, as shown in Figure 1 and ended when one of the mycelium colonies covered the entire plate. The percentages inhibition (P.I.) exerted by endophytic bacteria on the radial growth of *Phytophthora* mycelium were estimated according to the following formula [18].

$$\text{Percentage inhibition (P.I.)} = \left(1 - \frac{D_n}{D_t}\right) * 100.$$

Where P.I. (%) is the average percentage inhibition; D_n is the average diameter of mycelial colonies in the presence of bacteria and D_t is the average diameter of control plates mycelial colonies.

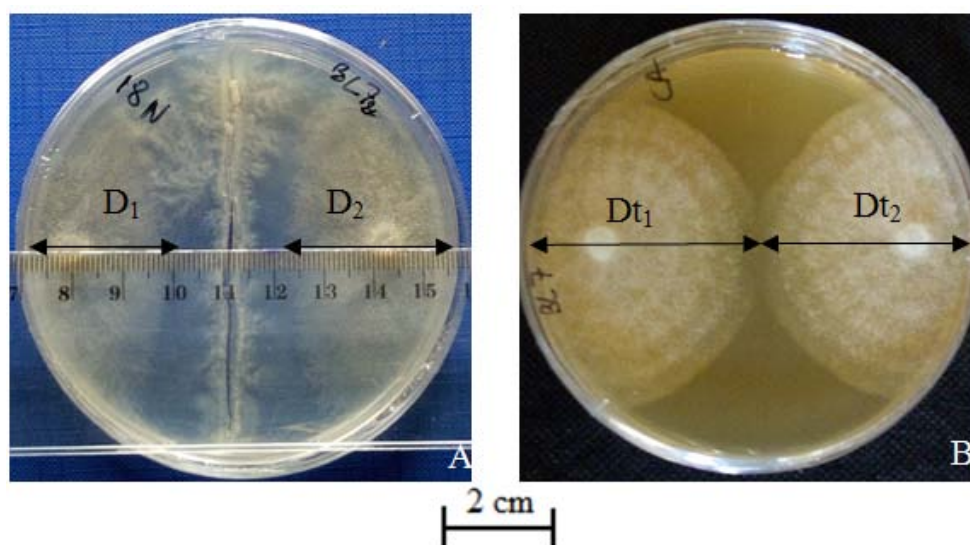


Figure 1. Measurement of *Phytophthora* spp. mycelium radial growth (A) in the presence of endophytic bacteria; (B) in the absence of endophytic bacteria. Where: $D_n = (D_1 + D_2)/2$; $D_t = (D_{t1} + D_{t2})/2$; D_n = average diameter of mycelium in the presence of bacteria; D_t = average diameter of control mycelial colonies

2.2.3. Survival Test of *Phytophthora* spp. on Wounded Pods

After thirty days of *in vitro* confrontation, seven bacteria (11P; 18N; 23P; 42P; 47P; 48P; 48P and 60P) having a percentage inhibition greater than or equal to 59 % with the two strains of *Phytophthora* were tested on wounded pods to see the survival and aggressiveness of the pathogen. Mycelium explants (05 mm in diameter) of each *Phytophthora* strain were collected along a line on the contact fronts of mycelium and bacterial colonies. The explants were inoculated in wounded pods at a rate of four pods per bacterial isolate. The pods were then placed in bins on foams soaked in distilled water and closed with black tarpaulins and were incubated at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ for five days.

2.2.4. Bacteria Inoculum Preparation

Fresh cultures of each bacterial isolate were performed in a pea extract broth. After forty eight (48) hours of incubation, the suspensions (10^9 CFU/mL) were diluted to a final concentration of 10^6 and 10^3 CFU/mL.

2.2.5. *Phytophthora* Inoculum Preparation

A suspension of zoospores of each strain was obtained from a sixteen-day-old culture on pea extract agar in Roux's vials. After six days of incubation in darkness, the cultures were exposed to a twelve-hour photoperiod (an alternation of 12 h/12 h darkness and fluorescent light) for ten days. In order to obtain zoospores release, cultures of *P. palmivora* and *P. megakarya* were flooded with sterile distilled water at 4°C and exposed to incandescent light for forty five minutes. The zoospores suspension was then adjusted with a Malassez hemacytometer (SOVIREL, France) to 3×10^5 zoospores/mL [19].

2.2.6. *In vivo* Antagonistic Effect of Endophytic Bacteria against *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya*

The *in vivo* antagonist effect of endophytic bacteria against *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya* was evaluated on leaf discs (15 mm in diameter). This test was conducted for each *Phytophthora* strain by a randomized four-factor split-plot experimental design. The first factor was the cocoa clone and three clones (NA32, PA150 and SCA6) which susceptibility to *Phytophthora* is known (susceptible, moderately resistant and resistant) were used. The second factor was the four bacterial isolates (60P; 48P; 18N and 23P) selected for good percentage inhibition. The third factor was the test of three concentrations ($C_1=10^3$, $C_2=10^6$, $C_3=10^9$ UFC/mL) of each bacterial inoculum. Finally, the fourth factor was the variation of three application periods of the bacterial inoculum. First period named (AV) consisted in applying the bacterial inoculum one hour before the inoculum of *Phytophthora* spp. The second period (P) consisted in simultaneously applying the bacterial inoculum and that of *Phytophthora* sp. Finally, the third period (AP) consisted in applying the bacterial inoculum one hour after the *Phytophthora* spp. The leaf discs placed in bins on foam of (01cm) thickness soaked in distilled water were inoculated with aliquots of 10 μL of suspension of each bacterial fresh culture at different concentrations 10^3 , 10^6 and 10^9 CFU/mL. Each

leaf disc then received, according to the type of treatment, 10 μL of a suspension of a strain of *Phytophthora* calibrated at 3×10^5 zoospores/mL. Controls were inoculated only with zoospore suspensions of the *Phytophthora* strains used. A total of thirty six treatments at the rate of nine treatments per bacterial isolates were applied to the leaf discs of the three cocoa clones used. Ninety leaf discs per clone arranged in three lines of ten discs per type of treatment were inoculated with each bacterial suspension and distributed in four bins each constituting a repeat. After inoculation of the leaf discs, each bin was covered with a black tarpaulin and incubated at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ for seven days. The results were read according to the Blaha scale [19,20], whose black pod symptom score ranged from 0 to 5 (0: no symptoms; 1: point of penetration; 2: network points; 3: cross-linked task; 4: marbled task; 5: real task).

2.2.7. Statistical Analyses

All data were analyzed using SAS[®] software 9.4 [21]. The P.I. were transformed at arcsinus to adjust them to the normal distribution [22] and then submitted with the data obtained in leaf discs tests to ANOVA according the PROC GLM program (Process of General Linear Model) followed by Student-Newman-Keuls test at the threshold $\alpha = 5 \%$.

3. Results and Discussion

3.1. Results

3.1.1. *In vitro* Antagonism Assay

Bacterial isolates of cocoa tree significantly inhibited mycelial growth of both *Phytophthora* strains in confrontation tests, as shown in Figure 2. The value of the P.I. of mycelium radial growth recorded after thirty days, varied significantly ($p < 0.05$) from 25.3 to 70.54 % depending on the bacterial isolates and the two fungal strains tested, as shown in Table 1. In fact, the isolates 48P; 18N; 42P; 60P; 47P; 47P and 23P were highly effective against *P. palmivora* with P.I. of 70.54 to 62.20% or diameters between 24.75 and 31.75 mm of mycelial growth. The isolates 42P; 47P; 60P; 18N; 22N; 66P and 63P were highly effective against *P. megakarya* with P.I. varying from 64.29 to 60.13% or diameters between 30 to 33.5 mm of mycelial growth. A total of four bacterial isolates 18N; 42P; 47P and 60P showed effective antagonistic activity against these two *Phytophthora* strains with P.I. above 60%.

3.1.2. Inhibitory Effect of Endophytic Bacteria on the Survival of *Phytophthora* spp

The results of survival and virulence tests of *Phytophthora* after thirty days of *in vitro* confrontation test with the seven effective bacterial isolates (11P; 23P; 42P; 47P; 48P; 60P and 18N) were variously conclusive. Indeed, mycelial plugs collected from the plates containing isolates 18N; 23P; 48P and 60P did not induce any symptoms of black pod disease in the wounded pods during five days of incubation. However, the other three isolates (11P; 42P and 47P) did not reduce this aggressiveness.

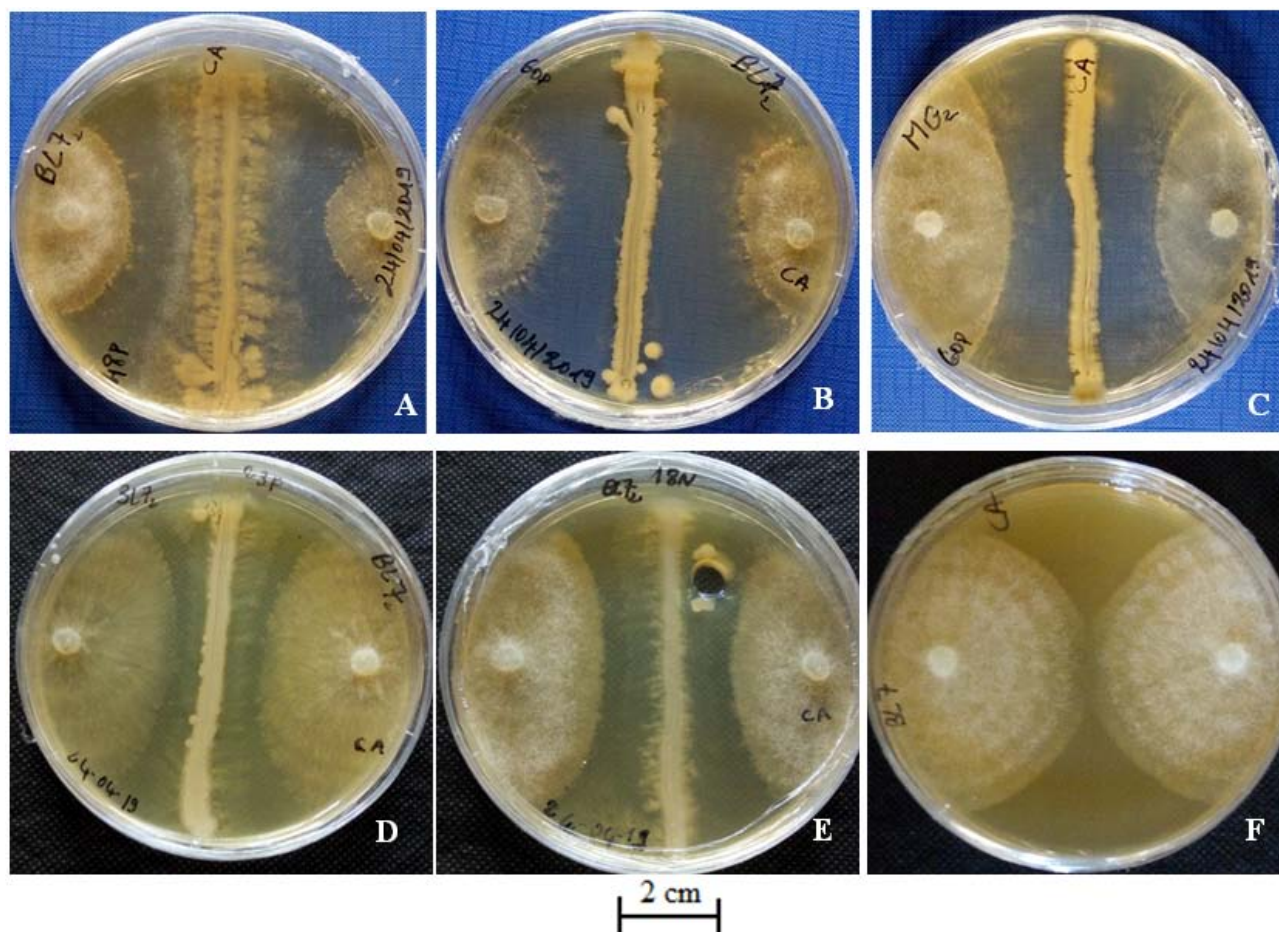


Figure 2. *In vitro* confrontation test of some cocoa endophytic bacteria against *Phytophthora* spp. (A) Isolate 48P; (B) Isolate 60P; (D) Isolate 23P; (E): Isolate 18N against *P. palmivora*; (C): isolat 60P against *P. megakarya*; (F): Control *P. palmivora* BL7.11.2

Table 1. *In vitro* inhibitory effects of some endophytic bacteria on mycelial growth of *Phytophthora* spp at thirty days of incubation

N°	Isolates	<i>P. palmivora</i>			<i>P. megakarya</i>			
		M.D±sd	P.I (%)±sd (%)±sdd(%)±sd	P.I trsf	Isolates	M.D±sd	P.I (%)±sd	P.I trsf
1	48P	24.75±3.59	70.54±4.28	0.787 ^a	42P	30.00±1.41	64.29±1.68	0.703 ^a
2	18N	28.25±1.25	66.37±1.49	0.727 ^b	47P	31.25±0.95	62.80±1.13	0.683 ^{ab}
3	42P	30.25±1.70	63.99±2.03	0.697 ^{bc}	60P	32.75±4.11	61.02±4.89	0.660 ^{abc}
4	60P	30.50±0.57	63.69±0.68	0.695 ^{bcd}	18N	33.00±2.94	60.72±3.50	0.658 ^{abcd}
5	47P	31.25±0.95	62.80±1.14	0.682 ^{cde}	22N	33.00±3.36	60.72±4.00	0.658 ^{abcd}
6	23P	31.75±1.25	62.20±1.49	0.675 ^{cdef}	66P	33.50±2.38	60.13±2.83	0.650 ^{bcd}
7	11P	34.00±2.00	59.53±2.38	0.645 ^{defg}	63P	33.50±2.38	60.13±2.83	0.650 ^{bcd}
8	40P	34.00±2.44	59.53±2.91	0.642 ^{efgh}	40P	33.75±2.06	59.83±2.45	0.645 ^{cdef}
9	14P	34.00±2.94	59.53±3.50	0.642 ^{efgh}	52N	34.00±3.65	59.53±4.34	0.643 ^{defg}
10	20N	34.50±4.50	58.93±5.35	0.635 ^{efghi}	65P	34.00±2.44	59.53±2.91	0.640 ^{defg}
11	50N	35.00±3.36	58.34±3.36	0.627 ^{fghi}	48P	34.50±4.43	58.94±5.27	0.633 ^{efg}
12	17N	36.75±1.82	56.25±2.63	0.600 ^{ghi}	23P	35.75±1.50	57.45±1.78	0.618 ^{fgh}
	Control	84.00	0.00	0.00	Control	84.00	0.00	0.00
	ANOVA	F=47.12	p<0.05	CV=6.92	ANOVA	F=25.19	p<0.05	CV=5.67

M.D (mm) = mycelium mean diameter; P.I (%) = percentage inhibition of mycelial growth; P.I trsf = percentage inhibition in transformed values ($y = \arcsin\sqrt{x}$); sd= standard deviation; CV (%) =coefficient of variation; the means with the same letter are not very different according to the Student Newman-Keuls test at the threshold $\alpha = 0.05$.

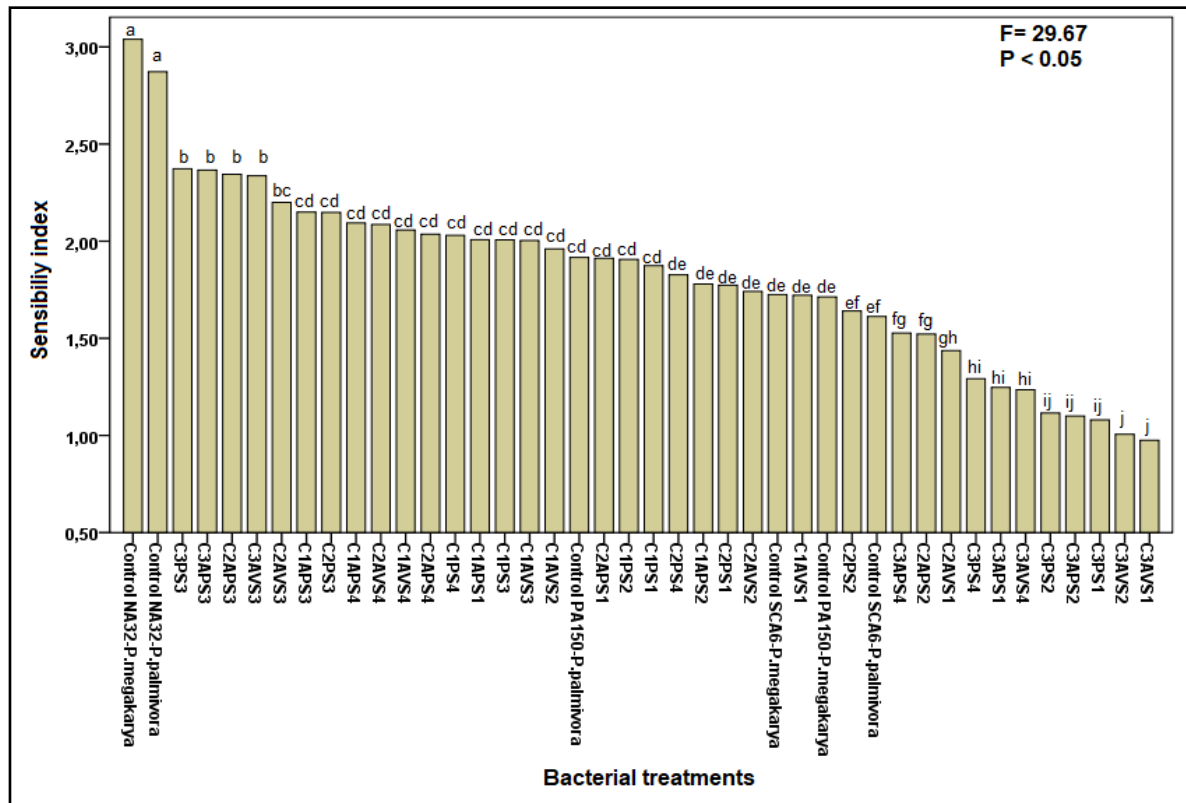


Figure 3. Effect of bacterial treatments on the susceptibility of three cocoa clones (NA32, PA150 and SCA6) to *Phytophthora* spp. C₁= Concentration 10³ CFU/ml; C₂= Concentration 10⁶ CFU/ml; C₃= Concentration 10⁹ CFU/ml; S1= Isolate 48P; S2= Isolate 18N; S3= Isolate 60P; S4= Isolate 23P; Averages with the same letter are not very different according to the Student Newman-Keuls test at threshold 5 %

3.1.3. *In vivo* Antagonist Effect of Endophytic Bacteria against *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya*

The application of bacterial treatments significantly reduced ($p < 0.05$) the susceptibility to black pod disease of the three clones. Significant effects ($p < 0.05$) of factors clone and timing of bacterial inoculum application were noted. Similarly a significant interaction effect ($p < 0.05$) of clone and bacterial factors on the black pod disease symptoms was observed. Treatments based on bacteria S1 (48P), S2 (18P) and S4 (23P) applied to foliar discs significantly reduced black pod disease necrosis induced by both *Phytophthora* strains to the three clones (NA32; PA150 and SCA6). Leaf discs treated with these bacteria showed mostly no symptoms or simple penetration point (indices values 0 or 1), unlike the clone NA32 controls where necrosis network (indices values 2.8 and 3.0) were observed for *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya*, as shown in Figure 3. Bacterial isolates S1 (48P) and S2 (18N) highly inhibited both *Phytophthora* strains. Furthermore, bacterial isolate S4 (23P) moderately inhibited both *Phytophthora* strains. Unlike the three bacterial isolates cited above, the isolate S3 (60P) showed no inhibitory effect towards the two *Phytophthora* strains. Because, treatments based on this bacteria were statistically close to the two controls of the clone NA32. Treatments at the concentration 10⁹ CFU/ml of the two bacterial isolates S1 (48P) and S2 (18N) were highly effective. These bacterial isolates effectively reduced black pod necrosis on the foliar discs of the three clones, particularly the susceptible clone NA32, as shown in Figure 3.

3.2. Discussion

Endophytic bacteria isolated from the vegetative organs of cocoa tree exerted *in vitro* a high inhibitory activity on the mycelial growth of the both strains of *Phytophthora*. After thirty days of confrontation *in vitro*, an effective reduction of the mycelium diameter and an inhibition zone on both sides of bacterial streaks were observed. That demonstrate isolates which hindered the growth of *Phytophthora* produced inhibitory substances [23]. Survival tests conducted on wounded pod confirmed the antagonistic effect of isolates 18N; 23P; 60P and 48P. However, isolates 42P; 47P and 11P were found to be ineffective. These isolates simply inhibited the growth of *Phytophthora* by competing for nutrients in the culture medium. Their antagonistic effects were simple fungistatic effects [3]. In contrast, isolates 18N; 23P; 60P and 48P could have fungicide effects against *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya*. Those effects would be more or less effective depending on the bacterial isolate and the strain of *Phytophthora*. Studies have shown the existence of *Phytophthora* antagonistic microorganisms in the cacao tree ecosystem [20,23].

These isolates inhibited the radial growth of *P. palmivora* (BL7.11.2) and *P. megakarya* (13P30.1) mycelium on carrot extract agar plates with P.I. of 28.58 % to 70.54 % and 25.3 to 64.29 % respectively. Similar results were obtained by Akrofi et al. [18] who showed that epiphytic bacteria isolated from pods surface of three resistant cocoa clones (SCA6, T85/799 and IFC5), highly inhibited the growth of *Phytophthora palmivora* with P.I. of 69.7 and 65.8 %. Isolates S1 (48P) and S2 (18N) effectively reduced black pod symptomatic necrosis onto all three

clones, particularly onto the susceptible clone NA32. This showed that these isolates induced resistance to the clone NA32 on the one hand, and increased the intrinsic resistance of the two clones (PA150 and SCA6) on the other hand. Kébé et al. [20] also isolated indigenous rhizobacteria from cocoa tree soils. These bacteria inhibited *Phytophthora palmivora* on leaf discs of two resistant cocoa clones (P7 and SCA6). According to Mejia et al. [24] the results of *in vitro* tests do not necessarily reflect those obtained *in vivo* or in field tests. Some microorganisms found to be highly antagonistic *in vitro* may be ineffective in *in vivo* or in field tests due to many ecological parameters.

The effectiveness of bacterial treatments applied for one hour on leaf discs before the introduction of the fungal inoculum proves that these endophytic bacteria, once installed, create a barrier against the penetration of pathogens in the stomata. This could explain the induction of resistance to the susceptible clone NA32. In addition, these isolates certainly produce antifungal substances that neutralize the development of zoospores on the foliar discs even when the inoculum of *Phytophthora* spp was applied one hour before the inoculum of the bacterial isolates was applied.

4. Conclusion

The cocoa tree naturally hosts endophytic bacteria that may have antagonistic effects against certain fungal pathogens such as *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora megakarya*. In fact, these bacterial isolates significantly inhibited, *in vitro*, the mycelial growth of these two strains of *Phytophthora* and induced resistance against *Phytophthora* spp. to different cocoa clones. This resistance induction was more remarkable to the clone NA32, susceptible to black pod disease. This study therefore proves the antagonistic potential of cocoa endophytic bacteria and their possible use in biological management of black pod disease. These bacterial isolates may be tested in pod tests and field trials to confirm the stability of their antagonistic effects against *Phytophthora* spp.

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Bakary Coulibaly, Research Technician and Mr. Touré Laurent, Research Assistant, at the Phytopathology laboratory, for the appreciable help provided during the leaf inoculation tests.

References

- [1] Ploetz R. The Impact of Diseases on Cocoa Production: A Global Overview in: B.A. Bailey, L.W. Meinhardt (eds.), *Cocoa Diseases*, Springer International Publishing Switzerland, p33-59. 2016.
- [2] Coulibaly K., Aka R. A., Camara B., Kassin E., Kouakou K., Kébé B. I., Koffi N. K., Tahy M. G., Walet N. P., Guiraud S. B., Assi M. E., Kone B., N'Guessan K. F., Koné D.. Molecular Identification of *Phytophthora palmivora* in the Cocoa Tree Orchard of Côte d'Ivoire and Assessment of the Quantitative Component of Pathogenicity. *Internationale journal de science*, 7 (8). 7-15. August 2018.
- [3] Mpika Joseph, Kebe Ismaël B., Druzhinina Irina S., Komon-Zélazowska Monika, Kubicek Christian P. & Aké Sevérin. Inhibition de *Phytophthora palmivora*, agent de pourriture brune des cabosses de cacao en Côte d'Ivoire, par *Trichoderma* sp. *Sciences & Nature*, 6(1). 49-62. Mars 2009.
- [4] Mbargaa J.B., Begoude B.A.D., Ambang Z., Meboma M., Kuate J., Schiffrers B., Ewbank W., Dedieu L., ten Hoopen G.M. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*, 77. 15-22. June 2014.
- [5] Pohe Jean, Pohe Sédjouény Steve Wilfrid, Okou Staelle Florence Famisso. Association oxyde de cuivre et metalaxyl dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacao en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 16(3). 2362-2368. January 2013.
- [6] Iwaro A.D., Thévenin J.-M., Butler D.R. and Eskes A.B. Usefulness of the detached pod test for assessment of cacao resistance to *Phytophthora* pod rot. *European Journal of Plant Pathology*, 113. 173-182. August 2005.
- [7] Tahy, G.M., Kébé, B.I., N'Goran, A.K.N., Sangaré, A., Mondeil, F., Cilas, C., Eskes, A.B. Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing lead disc inoculations with field observations. *Euphytica* 149, 35-44. November 2006.
- [8] Tjamos, E.C., Tjamos, S.E. & Antoniou, P.P. Biological management of plant diseases: Highlights on research and application. *Journal of Plant Pathology*, 92(4). 17-21. May 2010.
- [9] Soylu, S., Soylu, E.M., Kurt, S. & Ekici, O.K. Antagonistic potentials of rhizosphere-associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(1). 43-48. 2005.
- [10] Nur Rashyeda Ramli, Maizatul Suriza Mohamed, Idris Abu Seman, Madihah Ahmad Zairun & Nasyaruddin Mohamad The Potential of Endophytic Bacteria as a Biological Control Agent for *Ganoderma* Disease in Oil Palm. *Sains Malaysiana*, 45(3). 401-409. 2016.
- [11] Ouattara Adama, Coulibaly Klitoloma, Konate Ibrahim, Kebe Boubacar Ismaël, Tidou Abiba Sanogo, Filali-Maltouf Abdelkarim. Selection of Cocoa Tree (*Theobroma cacao* Linn) Endophytic Bacteria Solubilizing Tri-Calcium Phosphate, Isolated from Seedlings Grown on Soils of Six Producing Regions of Côte d'Ivoire. *Advances in Microbiology*, 9. 842-852. September 2019.
- [12] Melnick Rachel L., Suárez Carmen, Bailey Bryan A., Backman Paul A. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57. 236-245. March 2011.
- [13] Abdallah Aydi-Ben Rania, Marwa Hassine, Hayfa Jabnoun-Khiareddine, Hichem Ben Jannet & Mejda Daami-Remadi. Etude du pouvoir antifongique *in vitro* et *in vivo* des filtrats de culture et des extraits organiques des *Aspergillus* spp. contre *Phytophthora* sp. *Microbiol. Hyg. Alim*, 25(73).15-25. July 2013.
- [14] Rika Fithri, N.B., Aris Tri, W. & Nurita, T.M. Control activity of potential antifungal-producing *Burkholderia* sp. in suppressing *Ganoderma boninense* growth in oil palm. *Asian Journal of Agricultural Research*, 8. 259-268. 2014.
- [15] Konate, I., Ouattara, A., Coulibaly, B., Guei, N.K.R., Amani, K., Kouakou, I.K., Filali-Maltouf, A. and Koffi, M. Phenotypic Diversity of Associative Bacteria Isolated from Roots and Stems of Cacao (*Theobroma cacao*) Tree in Daloa, Côte d'Ivoire. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4. 560-570. August 2015.
- [16] Rayda S., Ines B. C., Tatiana V., Mohamed A. T., Mouna J., Manel C., Imen A., Amine E., Ahmad N., Frederique C., Radhouane G., Noureddine D., and Néji G. Analysis of the Cultivable Endophytic Bacterial Diversity in the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Evaluation of Its Antagonistic Potential against Pathogenic *Fusarium* Species that Cause Date Palm Bayound Disease. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 4(5). 93-104. September 2016.
- [17] Melnick Rachel L., Zidack Nina K., Bailey Bryan A., Maximova Siela N., Guiltinan Mark, Backman Paul A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, 46. 46-56. March 2008.
- [18] Akrofi A. Y., Terlabie J. L., Amoako-Attah I., Asare E. K.. Isolation and characterization of bacteria from different cacao progenies and their antagonistic activity against the black pod

- disease pathogen, *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Dis Prot*, 124.143-152. March 2017.
- [19] Nyassé S., Cilas C., Herail C. and Blaha G. Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. *Crop Protection*, 14(8). 657-663. January 1995.
- [20] Kébé Ismaël B., Mpika Joseph, N'Guessan Kouamé F., Hebbar Prakash K., Samuels Gary S. & AKE Severin. Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature*, 6 (1). 71-82. Avril 2009.
- [21] SAS. Guide to the use of PC-SAS Version 6.04 for DOS for Statistical Analysis. SAS Institute, Cary, North Carolina. 1995.
- [22] Gomez, K.A. & Gomez, A.A. Statistical Procedures for Agricultural Research. 2nd ed. Chapter 2. New York: John Wiley & Sons. pp. 7-83. 1984.
- [23] Acebo-Guerrero1 Y., Hernandez-Rodriguez A., Vandeputte O., Miguelez-Sierra Y., Heydrich-Perez M., Ye L., Cornelis P., Bertin P and El Jaziri M. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). *Journal of Applied Microbiology*, 119. 1112-1126. July 2015.
- [24] Mejia Luis C., Rojas Enith I., Maynard Zuleyka., Bael Sunshine Van, Arnold A. Elizabeth, Hebbar Prakash., Samuels Gary J., Robbins Nancy, Herre Edward Allen. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*. January 2008.



© The Author(s) 2020. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Selection of Cocoa Tree (*Theobroma cacao* Linn) Endophytic Bacteria Solubilizing Tri-Calcium Phosphate, Isolated from Seedlings Grown on Soils of Six Producing Regions of Côte d'Ivoire

Adama Ouattara¹, Klitoloma Coulibaly², Ibrahim Konate^{1*}, Boubacar Ismaël Kebe², Abiba Sanogo Tidou¹, Abdelkarim Filali-Maltouf³

¹UFR Agro-Forestry and Environment, Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Agrovalorization, Jean Lorougnon Guede University, Daloa, Côte d'Ivoire

²National Center for Agronomic Research (CNRA), Laboratory of Phytopathology, Divo, Côte d'Ivoire

³Faculty of Sciences, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University Mohammed V-Agdal, Rabat, Morocco

Email: coolkotiolo@yahoo.fr, *konatibrahim@yahoo.fr, filalimaltouf@gmail.com

How to cite this paper: Ouattara, A., Coulibaly, K., Konate, I., Kebe, B.I., Tidou, A.S. and Filali-Maltouf, A. (2019) Selection of Cocoa Tree (*Theobroma cacao* Linn) Endophytic Bacteria Solubilizing Tri-Calcium Phosphate, Isolated from Seedlings Grown on Soils of Six Producing Regions of Côte d'Ivoire. *Advances in Microbiology*, 9, 842-852.

<https://doi.org/10.4236/aim.2019.99051>

Received: July 22, 2019

Accepted: September 15, 2019

Published: September 18, 2019

Copyright © 2019 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Phosphorus (P) is an essential macronutrient for the growth and development of cocoa tree (*Theobroma cacao* Linn). Most of the soils used for cocoa farming in Côte d'Ivoire are low in phosphorus. But cocoa farmers generally have a widespread reluctance to invest in chemicals fertilizers due to high costs and environmental associated risk. Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) are known to play an important role in supply of phosphorus to plants in a sustainable manner in P deficient soils. The aim of this research was to screen the endophytic bacteria of cocoa nurseries able to solubilize tri-calcium phosphate. Seedlings of two varieties of cocoa (P7 and NA32) and seedlings of an all-comer, were grown on eighteen (18) samples soils collected in six producing regions of Côte d'Ivoire. A total of 218 endophytic bacteria were isolated and tested on the Pikovskaya's agar medium, containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The colonies with clear zone around the microbial growth were suspected as phosphate solubilizing bacteria. Out of 218 bacteria, 90 (41.28%) showed a clear zone around colonies after 7 days of incubation. The Phosphate Solubilization Index (PSI) ranged from 20% to 200%. Bacteria isolated from the soils of Duékoué locality showed the highest mean index of 137.67%. Five PSB (CEBSP5, CEBSP6, CEBSP7, CEBSP8, and CEBSP9) from Duékoué soils and two PSB (CEBSP12 and CEBSP13) from Soubré soils have a PSI ranged from 150% to 200%. Further study in greenhouse and in field condition will confirm the use of these PSB as biofertilizer to increase the available P content in soils, reduce environmental pollution and promote sustainable agriculture.

Keywords

Endophytic Bacteria, *Theobroma cacao*, Ti-Calcium Phosphate, Solubilization, Biofertilizer

1. Introduction

Phosphorus is one of the major nutrients for plant growth, and involved in the early stages of plant development [1]. It plays a key role in roots growth, tissue rigidity, formation of inflorescences and fruits [2]. It is also essential in the synthesis of living plant matter, in resistance to cold and diseases [3]. Despite its content is relatively high in soil, not all phosphorus is present in an available form for the roots [4]. Otherwise, plants are only able to assimilate phosphorus in its soluble forms primary and secondary orthophosphate ions H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} [5]. Then, to avoid deficiencies, phosphate fertilizer inputs may be recommended. But added 75% to 95% of phosphate fertilizer is precipitated by metals complexes existing in the soils [6]. In addition, these chemical fertilizers have a negative impact on the environment.

Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) play an important role in plant nutrition and growth, especially when phosphate fertilizers are used extensively for long periods of time. It has been proven that agricultural application of PSM boosts crop yields [7] [8]. The use of efficient phosphate-solubilizing microorganisms, opens a new horizon for better crop productivity and for greater yield performance without affecting the soil health. Phosphate solubilizing microorganism plays an important role in the plant nutrition through increase in P uptake by the plants and their use as PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) is an important contribution to biofertilization of agricultural crops [9] [10]. This could reduce production costs, minimize the misuse of chemical fertilizers, and increase soil fertility and crop yields over the long term [11]. In view of this property, these microorganisms are an ecological and economic interest for a sustainable agriculture. Recently, phosphate solubilizing bacteria (PSB) have attracted the attention of agriculturists for their use as biofertilizers to improve plant growth and yield [12].

In Côte d'Ivoire, 81% of the soils in the forest zone where cocoa (*Theobroma cacao* Linn) cultivation is practiced are low in phosphorus [13]. In addition, the cost of chemical fertilizers remains high for most farmers who are forced to resort to organic fertilizers such as poultry manure and sometimes cocoa pod compost. But this can pose a risk of plant infections with fungal agents such as *Phytophthora*, which causes brown pod rot [14]. Thus, it is necessary to investigate other sustainable and less expensive ecological alternatives to the chemical fertilization of cocoa. There is no data on the cocoa tree endophytic bacteria solubilizing the insoluble forms of soil phosphates into available forms for plants.

The aim of this research was to screen the endophytic bacteria of cocoa nurse-

ries able to solubilize tri-calcium phosphate. Specifically, this study investigated the ability of these cocoa isolates to form a transparent halo on solid Pikovkaya (PVK) medium and compare the efficiency of these isolates according to the provenances of soils collected in six producing regions of Côte d'Ivoire, on which the nurseries were carried out.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

2.1.1. Soils Samples

Eighteen (18) soils samples under cocoa (*Theobroma cacao* Linn) farms were collected in six producing regions of Ivory Coast whose central's localities are Aboisso, Abengourou, Daloa, Divo, Duékoué and Soubré. In each region, three soil samples were taken from three different plantations located at least within 15 kilometers of the central locality (**Figure 1**).

2.1.2. Plants Samples

The plant material was consisted of young cocoa seedlings (*Theobroma cacao* Linn) from a 45 day after sowing cocoa nursery, of two varieties (P7 and NA32) and an all-comer (Tv) grown on the collected soils. The seeds of the two varieties P7 and NA32 were collected at the National Research Center for Agronomic (CNRA) station of Divo (Côte d'Ivoire), the all-comer cocoa seeds were come from pods taken in orchards in the locality of Daloa. The nursery was made in

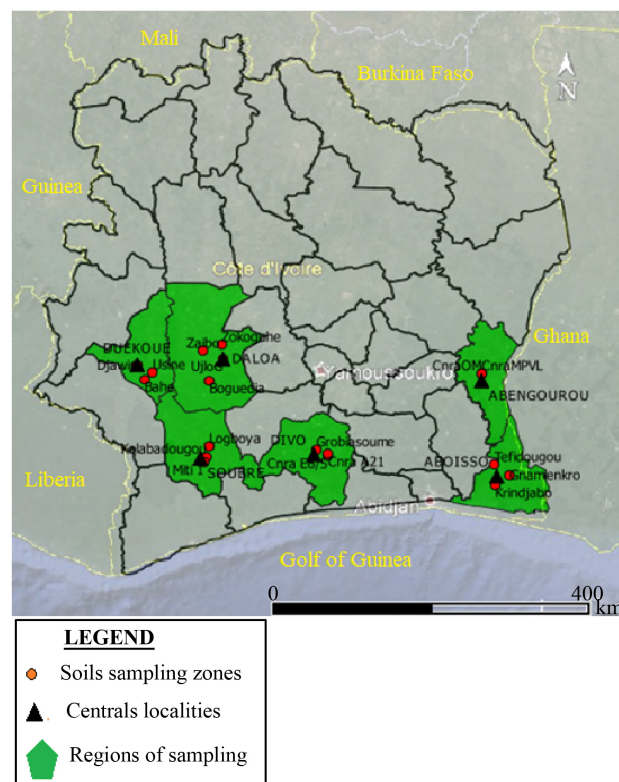


Figure 1. Map of soils sampling zones in Côte d'Ivoire.

order to trap rhizobacteria from collected soils. The varieties NA32 and P7 are respectively known to be susceptible and resistant to cocoa black pod in the field.

2.1.3. Bacteria Strains

A total of two hundred and eighteen (218) endophytic bacteria were isolated from the organs (roots, stems, leaves) of cocoa seedlings were tested *in vitro* to solubilize tri-calcium phosphate. The isolates considered as efficient were coded “CEBSP” (Cocoa Endophytic Bacteria Solubilizing Phosphate Tri-Calcium).

2.2. Methods

2.2.1. Soils Sampling

Soil samples were removed aseptically in the upper layers about 0 - 20 cm deep under cocoa trees. Before any sampling, the dead leaves of cocoa are released. Each sample (10 kg) of soil is obtained by mixing five samples of 2 kg of soil, taken at the four ends and at the center of a plot of at least one hectare of cocoa in production, after each sampling of materials are disinfected with alcohol.

2.2.2. Phosphate Solubilizing Test

The test was carried out on the solid PVK medium [15]. Before the test all bacteria were grown in a Yeast Extract Mannitol (YEM) broth during 48 hours to obtain bacterial suspensions of 10^9 cells/ml. A volume of 5 μ l of bacterial suspension of each isolate, was deposited in duplicate on the surface of the solid PVK medium. This medium is composing by of g/l: Glucose (10), Yeast extract (0.5), tri-calcium phosphate (5); ammonium sulfate (0.5); sodium chloride (0.2); magnesium sulfate (0.1); potassium chloride (0.2); manganese sulfate (0.002); iron sulfate (0.002) and agar (15), pH is adjusted to 7.0 [15]. After incubation at $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ for 7 days, the isolates capable of solubilizing the tri-calcium phosphate are surrounded by a transparent halo colony. The solubilization index of each efficient isolate was obtained by measuring the diameter of the colony and the diameter of the surrounding halo (Figure 2). The phosphate solubilization indices (PSI) were calculated according to the following formula [16]:

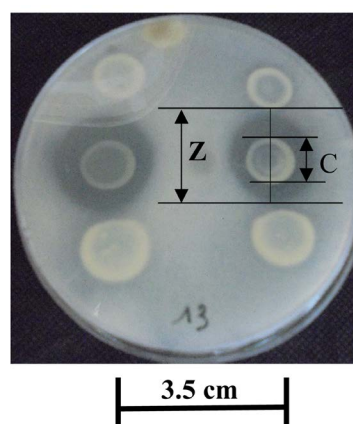


Figure 2. Phosphate solubilization on solid PVK medium. C = Bacteria colony diameter (mm) and Z = Phosphate solubilization zone or halo diameter (mm).

$$\text{PSI} = ((Z - C)/C) \times 100$$

PSI = Phosphate solubilization index.

Z = Diameter of the clear zone or halo (mm).

C = Diameter of the colony (mm).

3. Statistical Analysis

All data obtained were analyzed using R version 3.5.1 software [17]. All data reported were means of at least three replicates. One-way analysis of variance and Student-Newman-Keuls test were used to compare phosphate solubilization index of bacteria isolated from cocoa plants grown on different soils. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. For organs and varieties types, data do not follow the normal distribution, the non-parametric test of Mood was used to compare the medians of the tri-calcium phosphate solubilization indices.

4. Results and Discussion

4.1. Results

4.1.1. Endophytic Bacteria of Cocoa Solubilizing Phosphate

Bacteria solubilizing tri-calcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ were characterized by the appearance of a clear zone around colonies on solid PVK medium after 7 days of incubation at $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (Figure 2). A total of 90 bacteria among 218% or 41.28% of the collection were able to solubilize the tri-calcium phosphate on solid PVK medium. The solubilization indices were ranged from 20% to 200%. Twenty-two isolates have a solubilization index greater than or equal to 100%. Five isolates (CEBSP5, CEBSP6, CEBSP7, CEBSP8, and CEBSP9) from cocoa plants grown on Duékoué soils and two isolates (CEBSP12 and CEBSP13) from Soubré soils have a solubilization index ranged from 150% to 200% (Table 1).

Table 1. List of cocoa endophytic bacteria having phosphate solubilizing index $\geq 100\%$.

Strains	Soils origins	Varieties	Organs	PSI (%)
<i>CEBSP1</i>	Aboisso	P7	Root	100
<i>CEBSP2</i>	Aboisso	P7	Root	100
<i>CEBSP3</i>	Duékoué	P7	Root	114
<i>CEBSP4</i>	Duékoué	P7	Root	129
<i>CEBSP5</i>	Duékoué	P7	Root	150
<i>CEBSP6</i>	Duékoué	P7	Root	150
<i>CEBSP7</i>	Duékoué	P7	Root	186
<i>CEBSP8</i>	Duékoué	P7	Root	200
<i>CEBSP9</i>	Duékoué	NA32	Stem	191
<i>CEBSP10</i>	Soubré	P7	Leave	114
<i>CEBSP11</i>	Soubré	P7	Leave	143
<i>CEBSP12</i>	Soubré	P7	Stem	160

Continued

CEBSP13	Soubré	P7	Leave	150
CEBSP14	Daloa	Tv	Leave	122
CEBSP15	Daloa	Tv	Leave	111
CEBSP16	Daloa	Tv	Root	125
CEBSP17	Daloa	Tv	Root	100
CEBSP18	Daloa	Tv	Root	143
CEBSP19	Daloa	Tv	Root	133
CEBSP20	Daloa	Tv	Root	125
CEBSP21	Daloa	Tv	Stem	133
CEBSP22	Daloa	Tv	Root	100

4.1.2. Comparison of the Means Indices of Tri-Calcium Phosphate Solubilization

In general, the means solubilization indices of tri-calcium phosphate of cocoa (*Theobroma cacao* Linn) endophytic bacteria were significantly different ($p < 0.001$) depending on the localities from which the soil originate. Those prove that soil composition significantly influences the ability of bacteria to solubilize phosphate.

A difference was observed between the means of the phosphate solubilization indices of cocoa endophytic bacteria from different soils of the six regions (**Figure 3**). Bacteria isolated from cocoa plants grown on Duékoué soils were the most efficient and have the highest phosphate solubilization index ranged from 100% to 200% with an average index of 137.67% followed by those from Soubré and Aboisso soils. The lows solubilization indices were observed with the bacteria from Divo and Abengourou soils.

Student-Newman-Keuls test showed a significant difference ($p < 0.001$) between the means indices of bacteria isolated from Duékoué soils and those of Soubré, Aboisso, Daloa Abengourou, and Divo. According to this test the means with the same letter are not significantly different (**Figure 3**).

There was no significant difference ($p = 0.0985$) between the medians of phosphate solubilization indices of bacteria populations from different varieties P7, NA32 and all-comers (**Figure 4(a)**) on the one hand and those from different organs of cocoa plants ($p = 0.4685$) leaves, stems, and roots on the other hand (**Figure 4(b)**).

4.2. Discussion

The results obtained *in vitro* showed that 90 isolates in our collection showed a clear zone around the colonies on the solid PVK medium and the diameter of this zone varied from one isolate to another. This proved that these cocoa (*Theobroma cacao* Linn) endophytic bacteria are capable of producing enzymes to mineralize the soluble insoluble tri-calcium phosphate in primary and secondary ions orthophosphates H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} available to the plant [18].

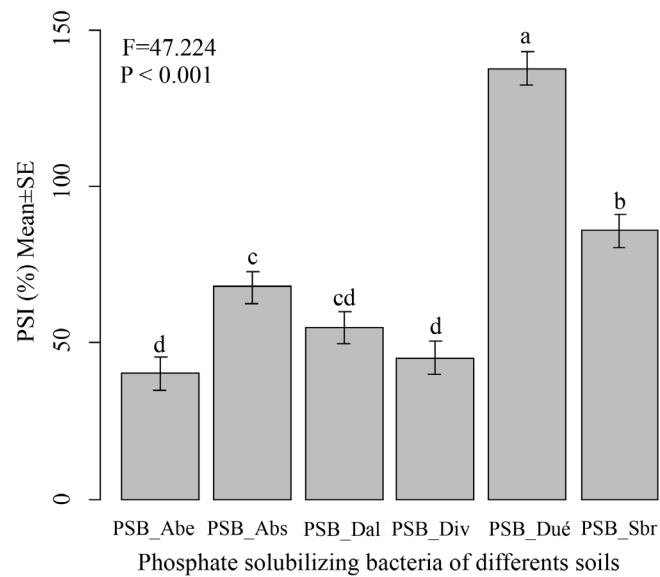


Figure 3. Bar plot of tri-calcium phosphate solubilization indices of cacao endophytic bacteria. Abe = Abengourou; Abs = Aboisso; Dal = Daloa; Div = Divo; Du  = Duékoué; Sbr = Soubré; SE = Standard error. The means with the same letter are not significantly different according to Student-Newman-Keuls test at level of alpha = 0.05.

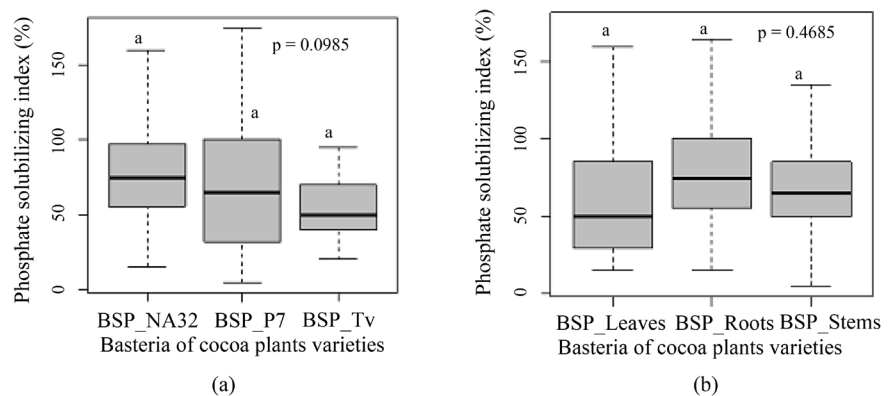


Figure 4. Box plots of tri-calcium phosphate solubilization indices of cacao endophytic bacteria. *Medians with the same letter are not significantly different. (a) Cocoa varieties; (b) Cocoa organs.

According to many researches, the solubilization of inorganic phosphate by microorganisms occurs mainly by producing organic acids such as gluconic acid, oxalic acid, citric acid, lactic acid and aspartic acid [19]. Thus, any isolate of this study surrounded by a clear zone on the PVK medium is capable to produce organic acids to mineralize the tri-calcium phosphate. However, this selection criterion is not infallible because some bacteria do not form a transparent halo in PVK solid medium, but they can solubilize tri-calcium phosphate in a liquid broth [20]. This aspect of the result can be explained by the weak diffusion in the solid medium of the acids produced by these bacteria during their growth [21].

In addition, the solubilization index of tri-calcium phosphates of cocoa endophytic bacteria vary from one soil to another. Bacteria isolated from plants

grown on soils sampled in the localities of Duékoué and Soubré have the highest average index. Unlike bacteria isolated from soils collected in four regions of (Daloa, Aboisso, Abengourou and Divo).

These results are similar to those obtained by Amadou [21], who isolated natural phosphate solubilizing bacteria from three soils in Mali. In this case, Solubilization index for phosphate rock varied from one soil to another. This difference can be explained by the fact that the microorganisms present in a soil low in soluble phosphate will provide more energy to mineralize insoluble phosphate reserves. Therefore, these microorganisms will be equipped with an enzymatic system more efficient than other microorganisms present in a soil rich in soluble phosphorus. The study of Balliah *et al.* [19] revealed that the population level of PSB was varied in different rhizospheres soils. This is mainly due to the abiotic factors of the soils. This was supported by Kucey [22], who demonstrated that PSB have been found in almost all soils tested, although the number varies with soil, climatic and cropping history. This large variation in the distribution of PSB in different soils may be due to the differences in organic carbon content of the soil [23]. It has been also reported that the percentage of phosphobacteria or Rhizobacteria may be accepted by soil physical properties, organic matter content, types and fertility and the way of farming [24]. Moreover, a study by Kassin *et al.* [13] who made the soil diagnosis in Côte d'Ivoire, showed that Duékoué soils are poorer in soluble form of phosphorus than the soils of Soubré, Divo, Aboisso and Abengourou localities which are more or less rich in phosphorus.

No difference was found between the solubilization indices of bacterial isolates from different varieties and organs of cocoa plants. This is explained by the fact that phosphorus is assimilated in soluble form and entered in the biological processes once inside the plant. There is no data about the endophytic bacteria of cocoa solubilizing phosphate. However, endophytic bacteria isolated from the roots and stems of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco showed a similar activity of solubilization of tri-calcium phosphate [25]. Various species of rhizospheres' bacteria, mycorrhizal fungi, actinomycetes and algae such as cyanobacteria have also been reported to show similar activity [26]. Moreover, in Côte d'Ivoire, preliminary studies conducted by Konate *et al.* [27] showed that endophytic bacteria isolated from cacao plants mainly belong to the genera of *Bacillus*, *Pseudomonas* and group of Actinomycetes. These bacteria solubilizing insoluble phosphate are interesting potential agents for the biofertilization of cocoa. Thus, in the literature, these bacteria solubilizing phosphate, also called phosphate bacteria, are cited as a sustainable ecological solution in plant fertilization [11].

5. Conclusion and Perspectives

This study showed that cocoa trees (*Theobroma cacao* Linn) harbor endophytes bacteria capable of solubilizing tri-calcium phosphate. A total of 90 bacteria among 218 or 41.28% of the collection were able to solubilize the tri-calcium phosphate on solid PVK medium. Solubilization index varied between 20% and

200%. In addition, bacteria isolated from soils collected in Duékoué region revealed the highest solubilization indices with a mean index of 137.67%. The confirmation of these results in greenhouse and field conditions will allow the final selection of efficient isolates in order to develop a bacterial inoculum for the Bioremediation and Biofertilization of cocoa trees in Côte d'Ivoire.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] Rfaki, A., Nassiri, L. and Ibjibijen, J. (2014) Genetic Diversity and Phosphate Solubilizing Ability of *Triticum aestivum* Rhizobacteria Isolated from Meknes Region, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, **8**, 1931-1938. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5956>
<https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/0AAC05444449>
- [2] Rfaki, A., Nassiri, L. and Ibjibijen, J. (2017) Occurrence of Phosphate Solubilizing Bacteria in the Rhizosphere of *Triticum aestivum* L. from Meknes, Morocco. *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, **4**, 1-7. <https://www.academia.edu/38310050/>
- [3] Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P.A. (2010) Plant Growth Promotion by Phosphate Solubilizing Fungi-Current Perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **56**, 73-98. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>
- [4] Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. (2013) Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. *SpringerPlus*, **2**, 587-601. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- [5] Khan, M.S., Zaidi, A. and Ahmad, E. (2014) Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. In: Khan, M., Zaidi, A. and Musarrat, J., Eds., *Phosphate Solubilizing Microorganisms*, Springer, Cham, 31-62. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5_2
<https://www.researchgate.net/publication/320322938>
- [6] Gurikar, C., Naik, M.K. and Sreenivasa, M.Y. (2016) Azotobacter: PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation. In: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, Springer India, New Delhi, 229-244. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_13
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-81-322-2647-5>
- [7] Khan, M.S., Zaidi, A. and Wani, P.A. (2007) Role of Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture—A Review. *Agronomy for Sustainable Development*, **27**, 29-43. <https://doi.org/10.1051/agro:2006011>
<https://www.researchgate.net/publication/41713464>
- [8] Aipova, R., Aitkeldiyeva, S.A., Kurmanbayev, A.A., Sadanov, A.K. and Topalova, O.B. (2010) Assessment of Biotechnological Potential of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Soils of Southern Kazakhstan. *Natural Science*, **2**, 841-845. <https://doi.org/10.4236/ns.2010.28105>
- [9] Krishnananda, P.I. and Dipika, A.P. (2017) Phosphate Solubilizing Microbes: An Overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, **6**, 844-852. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.099>

- [10] Puri, R.R., Dangi, S.R., Dhungana, S.A. and Itoh, K. (2018) Diversity and Plant Growth Promoting Ability of Culturable Endophytic Bacteria in Nepalese Sweet Potato. *Advances in Microbiology*, **8**, 734-761. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.89049>
- [11] Karpagam, T. and Nagalakshmi, P.K. (2014) Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Agricultural Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, **3**, 601-614.
- [12] Liu, M., Liu, X., Cheng, B.S., Ma, X.L., Lyu, X.T., Zhao, X.F., Ju, Y.L., Min, Z. and Fang, Y.L. (2016) Selection and Evaluation of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Grapevine Rhizospheres for Use as Biofertilizers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **14**, 1-10. <https://doi.org/10.5424/sjar/2016144-9714>
- [13] Kassin, E., Snoeck, D., Nguessan, J.-C., Yao-Kouamé, A. and Camara, M. (2014) Soil Mapping Project Final Report. CNRA, Cirad, Idh, World Cocoa Foundation, Conseil du café-cacao, Côte d'Ivoire, 18 p. <https://www.idhsustainabletrade.com/uploaded/2017/04/CNRA-SOIL-MAPPING-PROJECT-FINAL-REPORT.pdf>
- [14] Ruf, F., Kla, A.G., Dja, K. and Kiendré, J. (2014) La "fiente de poulet" dans les caçoyères de Côte d'Ivoire *une révolution agroécologique et sociale. Une innovation villageoise "frugale"* Rapport de mission 15 p. https://agritrop.cirad.fr/575862/1/document_575862.pdf
- [15] Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with Vital Activity of Some Microbial Species. *Microbiology*, **17**, 362-370.
- [16] Angraini, E., Rachmania, N.M. and Widyastuti, R. (2016) Study of Potassium Solubilizing Bacteria from Limestone Mining Area in Palimanan, Cirebon Quarry. *Malaysian Journal of Microbiology*, **12**, 62-68.
- [17] R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- [18] Pierzynski, G.M., McDowel, R.W. and Sims, J.T. (2005) Chemistry, cycling and potential Movement of Inorganic Phosphorus in Soils. In: *Phosphorus: Agriculture and the Environment*, ASA, CSSA & SSSA, San Antonio, TX, 53-86.
- [19] Baliah, N., Tenzing, G., Pandiarajan Kumar, B. and Makesh (2016) Isolation, Identification and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from Different Crop Soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Tropical Ecology*, **57**, 465-474. <https://www.researchgate.net/publication/298713924>
- [20] Nautiyal, C.S. (1999) An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphorus Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, **170**, 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- [21] Amadou, H.B. (2003) Mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali. Sols et génie agroalimentaire. Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'Alimentation, Université Laval Québec, Canada, 150 p. <https://corpus.ulaval.ca/jspui/bitstream/20.500.11794/17852/1/21179.pdf>
- [22] Kucey, R.M.N. (1983) Phosphate-Solubilizing Bacteria and Fungi in Various Cultivated and Virgin Alberta Soils. *Canadian Journal of Soil Science*, **63**, 671-678. <https://doi.org/10.4141/cjss83-068>
- [23] Yadav, K. and Singh, T. (1991) Phosphorus Solubilization by Microbial Isolate from *Caci fluvent*. *Journal of Indian Society for Sciences*, **39**, 89-93.
- [24] Liu, H., Wu, X.Q., Ren, J.H. and Ye, J.R. (2011) Isolation and Identification of Phosphobacteria in Poplar Rhizosphere from Different Regions of China. *Pedosphere*

phere, **21**, 90-97. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60083-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60083-5)

- [25] Konate, I., Koulibaly, A., Coulibaly, I. and Berraho, E.B. (2014) Phosphate Solubilizing of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Associative Bacteria Analyzed by Molecular Technique ARDRA. *International Journal of Science and Research*, **3**, 473-479. <https://www.ijsr.net/archive/v3i12/U1VCMTQzNTA=.pdf>
- [26] Mandlaa, Zhang, Y., Wan, Y., Tie, Y., Zhang, B., Wang, R. and Wang, G. (2019) Isolation and Characterization of Endophytic Fungi from Purslane and the Effects of Isolates on the Growth of the Host. *Advances in Microbiology*, **9**, 438-453. <https://doi.org/10.4236/aim.2019.95026>
http://www.scirp.org/pdf/AiM_2019051514330984.pdf
- [27] Konate, I., Ouattara, A., Coulibaly, B., Guei, N.K.R., Amani, K., Kouakou, I.K., Filali-Maltouf, A. and Koffi, M. (2015) Phenotypic Diversity of Associative Bacteria Isolated from Roots and Stems of Cacao (*Theobroma cacao*) Tree in Daloa, Côte d'Ivoire. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **4**, 560-570. <https://www.ijcmas.com/vol-4-9/Ibrahim%20Konate,%20et%20al.pdf>

RÉSUMÉ

En Côte d'Ivoire, la cacao-culture est fortement menacée par la pourriture brune des cabosses du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) due aux agents pathogènes *Phytophthora* spp. ainsi que la baisse de la fertilité des sols. Pour remédier à ces contraintes, les paysans utilisent généralement les fongicides et les engrais de synthèse. Or ces produits sont parfois coûteux et même dangereux pour la santé humaine et environnementale. L'utilisation de microorganismes endophytes associés aux cacaoyers est considérée comme une alternative écologique durable. Cette étude avait pour objectif général de rechercher des bactéries endophytes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) capables d'améliorer la croissance de la plante et de lutter contre la pourriture brune des cabosses. Des bactéries endophytes ont été isolées de jeunes plants issus de deux clones de cacaoyers Pound 7 et Nanay 32 et d'un hybride guyanais. Ces plants ont été cultivés sur différents sols collectés dans des cacaoyères de six régions productrices afin de piéger les bactéries indigènes. La sélection des bactéries endophytes d'intérêt a été faite selon différents niveaux de criblage. Le premier criblage a concerné les bactéries endophytes promotrices de la croissance de la plante. Ce criblage a été réalisé par l'utilisation de milieux sélectifs pauvres en azote (N), en phosphore (P) et en potassium (K). Le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) et le mica ont été utilisés respectivement comme sources insolubles de phosphore et de potassium. Le second criblage a consisté à rechercher des bactéries endophytes antagonistes de *Phytophthora palmivora* et de *Phytophthora megakarya* *in vitro* et *ex-vivo* sur disques foliaires. Sur deux cent dix-huit (218) bactéries endophytes isolées, sept isolats d'intérêt agronomique 4P, 5P, 38P, 39P, 40P, 41P et 53N et deux d'intérêt environnemental 21P et 37N ont été révélés efficaces à l'issue de la caractérisation phénotypique. Ces endophytes bactériens appartiennent à deux genres présumés principaux identifiés *Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp. Le second criblage a révélé quatre endophytes bactériens 23P, 48P, 60P et 18N antagonistes *in vitro* de *Phytophthora palmivora* (BL7.11.2) et de *Phytophthora megakarya* (13P30.1) avec des pourcentages respectifs d'inhibition de la croissance mycélienne de 70,5 et 64,2 %. Dans les biotests, deux isolats 48P et 18N ont réduit efficacement les symptômes nécrotiques de la pourriture brune sur les disques foliaires de trois clones Nanay 32, Parinari 150 et Scavina 6 respectivement sensible, moyennement résistant et résistant à la pourriture brune. Ces isolats ont induit une résistance systémique au clone sensible et ont augmenté la résistance intrinsèque des clones résistants. Cette étude prouve donc qu'il est possible d'utiliser des endophytes bactériens dans le biocontrôle de la pourriture brune des cabosses, la biofertilisation du cacaoyer et la biorestauration des sols.

Mots clés: Cacaoyer, Bactéries endophytes natives, Efficentes, Biocontrôle, *Phytophthora* spp., Pourriture brune

ABSTRACT

In Côte d'Ivoire, cocoa farming is seriously threatened by the black pod disease of cocoa tree (*Theobroma cacao* L.) due to the pathogens *Phytophthora* spp. as well as the decline of soil fertility. To overcome these constraints, farmers generally use fungicides and synthetic fertilizers. However, these products are sometimes expensive and even dangerous for human and environmental health. The use of endophytic or rhizospheric microorganisms associated with cocoa trees is considered as a sustainable ecological alternative. This study aimed to research efficient native endophytic bacteria of cocoa tree capable of promoting plant growth and combating black pod disease. Endophytic bacteria were isolated from young plants of two cocoa clones Pound 7 and Nanay 32 and a Guyanese hybrid. These plants were grown on different soils collected in cocoa plantations in six producing regions in order to trap native bacteria. The selection of endophytic bacteria of interest was made according to different levels of screening. The first screening concerned endophytic bacteria that promote plant growth. This screening was carried out using selective media poor in nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K). Tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) and mica have been used as insoluble sources of phosphorus and potassium, respectively. The second screening consisted in searching for endophytic bacteria antagonizing *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora megakarya* *in vitro* and *ex-vivo* on leaf discs. As results, seven bacterial endophytes of agronomic interest (4P, 5P, 38P, 39P, 40P, 41P and 53N) and two of environmental interest (21P and 37N) were revealed to be effective following phenotypic characterization. These bacteria belong to two main genera (*Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. The second screening revealed four bacterial endophytes (23P, 48P, 60P and 18N) antagonists of *P. palmivora* (strain BL7.11.2) and *P. megakarya* (strain 13P30.1) with respective percentages inhibition of mycelial growth of 70.5 and 62.4 %. In the biotests, two isolates 48P and 18N effectively reduced necrotic symptoms of black pod disease on the leaf discs of three clones NA32, PA150 and SCA6. These isolates induced systemic resistance to the sensitive clone and increased the intrinsic resistance of clones. This study therefore proves that it is possible to use endophytic bacteria in biocontrol of black pod disease and biofertilization of cocoa tree in Côte d'Ivoire.

Keys words: Cocoa tree, Natives endophyte bacteria, Efficient, Biocontrol, *Phytophthora* spp., Black pod disease